

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Pesquisas Hidráulicas

**REMOÇÃO DOS COMPOSTOS 2-METILISOBORNEOL E GEOSMINA
DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO POR CARVÃO ATIVADO
GRANULAR E AÇÃO MICROBIANA**

Viviane Berwanger Juliano

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental
da UFRGS como requisito parcial para a
obtenção do título de doutor em Recursos
Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Dr. Luiz Fernando Cybis

Co-Orientadora: Dra. Sueli Van Der Sand

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Ana Paula Guedes Frazzon (ICBS/UFRGS)

Prof. Dr. Antônio Domingues Benetti (IPH/UFRGS))

Prof. Dr. Alessandro Minillo (Faculdade de Engenharia/UNESP - Ilha Solteira)

Porto Alegre, agosto de 2010.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas e no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) através do Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (PROSAB), edital 5, tema 1.

Dedico esta tese ao Rafael, meu grande amor, pelo incentivo científico, apoio e paciência em todos os momentos deste trabalho e na nossa vida. Agradeço à dedicação, confiança, carinho, amor e respeito que temos um com o outro, permitindo a construção de uma vida cheia de alegrias juntos.

Orgulho-me muito de ti, pelo profissional e pessoa de caráter que és, continua assim, me fazendo uma pessoa FELIZ.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cybis pelos desafios, orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

À Professora Sueli pelos ensinamentos, acolhida e confiança ao permitir que eu fizesse parte do Laboratório 164, acreditando na realização desta tese.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de saneamento: Andrea, Eliete, Lúcia, Roberto, Saulo, Simone e Viviane, que me deram força naqueles momentos fatídicos de “falta de água, luz e internet” e também nos bons momentos de amizade e terapia !!!

Às minhas colegas e amigas do laboratório 164: Daniele, Julie, Margaroni, Sabrina, Rebeca, Gisele, Aline, Mariana, Themis, Tiele, Karina e Mica, todas sempre dispostas em ajudar.

À Paola pela amizade e dedicação que teve comigo e com o trabalho.

Às minhas amigas do coração Carolina, Daniela, Cíntia e Simone pela amizade, incentivo e força em todos os momentos.

Às pesquisadoras e amigas Saionara Salomoni, Sandra Maria Alves da Silva e Vera Regina Werner pelo incentivo na vida acadêmica, profissional e amizade ao longo dos anos.

À minha família: meu pai Fernando, meu irmão Fabio, meus sogros, Virgínia e Cristino pelo apoio e carinho que sempre tiveram comigo e, principalmente, à minha querida mãe Ana Maria que sempre me incentivou, deu carinho e amor incondicional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e ao Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (PROSAB) pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
Apresentação.....	xvi
Capítulo I: Introdução Geral.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Justificativa.....	3
1.2 Objetivo Geral.....	4
1.2.1 Objetivos específicos.....	4
1.3 Revisão Bibliográfica.....	5
1.3.1 Florações de cianobactérias.....	5
1.3.2 Metabólitos MIB e geosmina.....	7
1.3.2.1 Efeitos na saúde humana.....	10
1.3.2.2 Métodos analíticos de detecção de MIB e geosmina.....	10
1.3.3 Tratamento de água: remoção de gosto e odor.....	11
1.3.3.1 Carvão Ativado.....	15
1.3.3.1.1 Carvão Ativado em Pó.....	18
1.3.3.1.2 Carvão Ativado Granular.....	18
1.3.3.1.3 Isotermas de adsorção.....	19
1.3.4 Degradação biológica dos compostos MIB e geosmina.....	21
1.3.4.1 Isolamento e caracterização de bactérias capazes de degradar MIB e geosmina.....	27
1.3.5 Processos de Filtração Biológica.....	28
1.4 Delineamento Experimental.....	34
1.4.1 Descrição da área de obtenção dos inóculos de bactérias.....	34
1.4.2 Isolamento e identificação das bactérias capazes de degradar MIB e geosmina.....	37
1.4.2.1 Coleta dos inóculos.....	37
1.4.2.2 Isolamento das bactérias.....	37
1.4.2.3 Seleção das bactérias.....	39

1.4.2.4 Identificação dos isolados bacterianos.....	40
1.4.3 Degradação biológica dos compostos MIB e geosmina.....	42
1.4.4 Remoção dos compostos MIB e geosmina por CAG.....	43
1.4.4.1 Caracterização dos carvões.....	43
1.4.4.2 Determinação do tempo de equilíbrio de adsorção.....	44
1.4.4.3 Determinação das Isotermas de Freundlich.....	44
1.5 Análise dos compostos MIB e geosmina.....	44
1.6 Apresentação dos Resultados.....	46
Capítulo II: Avaliação da capacidade adsortiva de diferentes carvões ativados granulares na remoção de 2-metilisoborneol e geosmina.....	47
Capítulo III: Biodegradação dos compostos causadores de gosto e odor (2-metilisoborneol e geosmina) em manancial de abastecimento de água no Rio Grande do Sul, Brasil.....	64
Capítulo IV: Removal of 2-methylisoborneol and geosmin from water by bacteria: isolation, identification and biodegradation potential.....	78
Capítulo V: Discussão Geral.....	97
5. DISCUSSÃO GERAL.....	98
5.1 Remoção de MIB e geosmina por adsorção em CAG.....	98
5.2 Isolamento e caracterização de bactérias capazes de degradar MIB e geosmina.....	99
5.3 Biodegradação de MIB e geosmina.....	101
Capítulo VI: Conclusões	105
6. CONCLUSÕES.....	106
6.1 Conclusões.....	106
6.2 Recomendações.....	107
Capítulo VII: Referências Bibliográficas.....	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
Capítulo VIII: Anexos.....	123
8. ANEXOS.....	124

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Registro das concentrações dos compostos MIB e geosmina em águas naturais..... 9

Tabela 2: Microrganismos relacionados à biodegradação dos compostos MIB e geosmina (Ho *et al.*, 2007)..... 24

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), posição, alvo, sequência e referências bibliográficas..... 41

Tabela 4: Tipo e procedência do CAG utilizado nos testes de remoção de MIB e geosmina..... 43

Tabela 5: Condições de extração dos compostos MIB e geosmina através do método de microextração em fase sólida..... 45

Tabela 6: Condições de análise cromatográfica dos compostos MIB e geosmina no Cromatógrafo a gás Varian 3800..... 45

Tabela 7: Condições de análise por espectrometria de massas dos compostos MIB e geosmina..... 45

CAPÍTULO II

Tabela 1: Determinação granulométrica e número de iodo para os CAGs de madeira, casca de coco e osso..... 55

Tabela 2: Área superficial e distribuição do volume de poros para os CAGs de madeira, casca de coco e osso..... 56

Tabela 3: Concentrações iniciais e residuais de MIB e geosmina na aplicação de seis doses dos carvões de madeira, casca de coco e osso..... 57

Tabela 4: Constantes K e n obtidas a partir das Isotermas de Freundlich para os carvões de madeira, casca de coco e osso na remoção dos compostos MIB e geosmina..... 59

Tabela 5: Classificação da capacidade de adsorção dos CAGs de madeira, casca de coco e osso por quatro diferentes características..... 60

CAPÍTULO III

Tabela 1: Parâmetros ambientais da água do Lago Guaíba durante a coleta dos inóculos de bactérias e após a formação do biofilme..... 71

CAPÍTULO IV

Table 1: Physical and chemical variables of Guaíba Lake water during the collection of inoculum for the Experiment I (P1 - without cyanobacteria bloom) and Experiment II (P2 - with cyanobacteria bloom)..... 85

Table 2: Similarity between the bacterial isolates from Guaíba Lake and strains obtained from GenBank after analysis of gene sequences..... 88

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Estrutura química dos compostos MIB (A) e geosmina (B) (Fonte: Freitas *et al.*, 2008)..... 7

Figura 2: Localização da Região Hidrográfica do Lago Guaíba (Fonte: UFRGS/Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba)..... 35

Figura 3: Aparato experimental para o isolamento das bactérias. Legenda: 1) reservatório superior para circulação da solução (MIB, geosmina e água do Lago Guaíba contendo inóculos de bactérias); 2) coluna com carvão antracitoso para formação do biofilme; 3) reservatório inferior; 4) bomba peristáltica..... 38

CAPÍTULO II

Figura 1 - Isotermas de Freundlich para os carvões de madeira, casca de coco e osso na remoção de MIB..... 58

Figura 2 - Isotermas de Freundlich para os carvões de madeira, casca de coco e osso na remoção de geosmina..... 58

CAPÍTULO III

Figura 1: Concentrações residuais de MIB e geosmina e massa celular da bactéria F1 após o processo de biodegradação..... 72

Figura 2: Concentrações residuais de MIB e geosmina e massa celular da bactéria F2 após o processo de biodegradação..... 72

Figura 3: Concentrações residuais de MIB e geosmina no experimento controle do processo de biodegradação da bactéria F1..... 73

Figura 4: Concentrações residuais de MIB e geosmina no experimento controle do processo de biodegradação da bactéria F2..... 74

Figura 5: Porcentagem de remoção dos compostos MIB e geosmina no processo de biodegradação da bactéria F1..... 74

Figura 6: Porcentagem de remoção dos compostos MIB e geosmina no processo de biodegradação da bactéria F2..... 75

CAPÍTULO IV

Figure 1: Neighbor-joining phylogenetic tree showing the position of 13 isolates in relation to other closely related genera and/or species. Numerical values on the tree represent bootstrap support. 89

Figure 2: Biodegradation of MIB and geosmin compounds for 13 isolates from Guaíba Lake. The bars represent the remaining concentrations and the lines the percentage of MIB and geosmin removed after 48 hours. The letter C indicates the substrate control without bacteria. 90

LISTA DE ABREVIATURAS

Ágar Padrão para Contagem = ACP

Associação Brasileira de Normas e Técnicas = ABNT

Capacidade Máxima Adsorptiva = $q_{e,máx}$

Carvão Ativado = CA

Carvão Ativado em Pó = CAP

Carvão Ativado Granular = CAG

Departamento Municipal de Água e Esgoto = DMAE

Eletroforese em Gel por Gradiente de Desnaturação = DGGE

Estação de Tratamento de Água = ETA

Gram-positivas = Gram⁺

Gram-negativas = Gram⁻

Limite de Detecção Olfativa = LDO

Matéria Orgânica Natural = MON

Meio Mineral = MM

2-metilisoborneol = MIB

Reação em Cadeia da Polimerase = PCR

Trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol = geosmina

Trihalometanos = THM

Unidades formadoras de colônias = UFC

RESUMO

O processo de eutrofização das águas, principalmente pelo aporte de fósforo e nitrogênio, favorece a ocorrência de florações de cianobactérias. Uma consequência desses eventos é a produção e emissão dos metabólitos 2-metilisoborneol (MIB) e trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol (geosmina). Estes compostos são álcoois terciários que podem ser detectados em baixas concentrações pelos consumidores, 5 a 10 ng/l, deixando a água com “cheiro e gosto de terra e mofo”. MIB e geosmina, particularmente na forma dissolvida (extracelular), mostram-se recalcitrantes aos métodos convencionais de tratamento de água. As metodologias atualmente empregadas na remoção desses metabólitos apresentam-se pouco eficientes e de elevado custo operacional, incentivando as pesquisas relacionadas às alternativas de tratamento.

O presente estudo foi realizado em duas etapas, onde a primeira buscou avaliar a remoção de MIB e geosmina por adsorção em carvão ativado granular e a segunda, a degradação dos metabólitos por atividade microbológica. Primeiramente, os carvões ativados granulares foram caracterizados através do número de iodo e área superficial BET. Em seguida, foi determinado o tempo de equilíbrio de adsorção para cada carvão e por último, foi avaliada a capacidade adsortiva através das Isotermas de Freundlich. O estudo sobre a oxidação biológica dos compostos causadores de gosto e odor consistiu no isolamento, identificação e testes de biodegradação de bactérias que utilizam MIB e geosmina como única fonte de carbono para o seu metabolismo.

No que se refere à capacidade de adsorção, foi observado que os carvões de madeira e casca de coco apresentaram os melhores desempenhos na remoção de MIB e geosmina, respectivamente. Esses carvões removeram os compostos abaixo do limite de detecção olfativa (10 ng/l), com doses de 50 mg/l e tempo de contato de duas horas. Essa caracterização mostrou-se de fundamental importância na escolha do carvão mais adequado para aplicação no tratamento de água.

Uma vez que pouco se conhece a respeito da comunidade bacteriana, presente em águas naturais, ao que se sabe, este trabalho é o primeiro registro da capacidade individual de bactérias Gram positivas e negativas degradarem os compostos causadores de gosto e odor, na mesma solução teste. A remoção de cerca de 90 e

96% de MIB e geosmina ao longo de 48 e 120 horas de experimento, respectivamente, demonstrou que essas bactérias podem ser utilizadas em estratégias de purificação biológica da água.

A identificação molecular dos isolados bacterianos, obtidos no Lago Guaíba, registrou quatro novos gêneros capazes de degradar MIB e geosmina: *Burkholderia* sp, *Caulobacter* sp, *Klebsiella* sp e *Leucobacter* sp. Além desses, um isolado foi classificado como *Arthrobacter* sp, outro como Sphingomonadaceae e três como Enterobacteriaceae.

O sucesso no isolamento, manutenção de culturas puras, identificação e determinação da capacidade desses microrganismos degradarem MIB e geosmina da água sugere um potencial de utilização dessas bactérias em processos de filtração biológica, que utilizam carvão ativado granular. Esse conhecimento pode ser usado como uma nova ferramenta para a remoção de substâncias que causam gosto e odor, sendo essencial para garantir uma água de qualidade para o consumo humano.

ABSTRACT

Water eutrophication process, by phosphorous and nitrogen levels, allows cyanobacteria blooms which promotes, among other effects, the generation and release of the metabolites 2-methylisoborneol (MIB) and trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol (geosmin). These compounds are tertiary alcohols that may lend earthy-musty tastes and odors to water, characteristics detected by consumers when the metabolites are present at concentrations as low as 5 to 10 ng/l. When present in water, mainly in the dissolved form (extracellular), MIB and geosmin are difficult to be removed by conventional treatment methods. The methodologies currently employed to remove these metabolites lack efficiency and increase operational costs, arousing the interest in research to develop alternative water treatment approaches.

The present study was conducted in two steps. The first step evaluated the removal of MIB and geosmin by adsorption using different types of granular activated carbon, while the second step assessed the degradation of the metabolites by microbiological activity. Firstly, granular activated carbon was analyzed for iodine number and BET surface area. Next, adsorption equilibrium time was measured for each carbon type. Then, adsorption capacity was evaluated using the Freundlich isotherm. Biological oxidation of compounds causing taste and odor included isolation, identification and biodegradation tests using bacteria that employ MIB and geosmin as the only carbon sources.

Regarding adsorption capacity, wood and coconut shell carbon performed better in MIB and geosmin removal, respectively, affording removal to levels below the odor threshold concentration (10 ng/l), using 50 mg/l solutions of each carbon and exposure times of 2 h. This characterization proves the importance of choosing the most appropriate carbon to employ in water treatment.

Since little is known on the bacterial community thriving in natural waters, as far as we know this is the first study to record the capacity of Gram-positive and Gram-negative bacteria to individually degrade compounds that cause taste and odor in water, in the same test solution. The removal of 90 and 96% of MIB and geosmin within 48 and 120 h of exposure, respectively, shows that these bacteria may be used in water purification strategies.

The molecular identification of the bacterial isolates obtained in Lake Guaíba

revealed four new genera capable to degrade MIB and geosmin: *Burkholderia* sp., *Caulobacter* sp., *Klebsiella* sp., and *Leucobacter* sp. Apart from these isolates, one *Arthrobacter* sp., one Sphingomonadaceae and three Enterobacteriaceae isolates were also identified.

The successful isolation, maintenance of pure cultures, identification and determination of these microorganisms' capacities to degrade MIB and geosmin in water suggests that these bacteria may be used in biological filtration processes that utilize granular activated carbon. This knowledge may be used as a new tool to remove substances that lend taste and odor to water, and is an essential aspect to guarantee quality water for human consumption.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A tese foi estruturada em oito capítulos:

Capítulo I: composto de uma introdução, onde é apresentada uma visão geral do trabalho, justificativa, objetivos gerais e específicos, revisão bibliográfica sobre os temas estudados e delineamento experimental.

Capítulo II: neste capítulo foi avaliada a capacidade adsortiva de diferentes carvões ativados granulares na remoção de MIB e geosmina.

Capítulo III: aborda a capacidade de biodegradação de dois isolados bacterianos e a caracterização do seu crescimento específico, utilizando somente MIB e geosmina como fonte de carbono.

Capítulo IV: relata o estudo sobre o isolamento e identificação de bactérias que degradam MIB e geosmina, bem como seus potenciais de biodegradação.

Capítulo V: composto da discussão geral.

Capítulo VI: apresenta as conclusões e as recomendações do trabalho.

Capítulo VII: neste capítulo estão inseridas as referências bibliográficas citadas nos seis capítulos anteriores.

Capítulo VIII: no último capítulo estão inseridos os anexos do trabalho.

Os capítulos II, III, IV foram assim divididos, pois estão na forma de artigos científicos e escritos de acordo com as normas das revistas específicas sobre cada tema abordado.

Capítulo I

Introdução Geral



1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos recursos hídricos provenientes de atividades antrópicas, como descarga de esgoto doméstico, efluentes industriais e resíduos da drenagem urbana, tem provocado mudanças na qualidade da água, acelerando o processo de eutrofização artificial, inclusive em mananciais de abastecimento. Também, a utilização de adubos e fertilizantes em áreas agrícolas contribui com elevada carga de nutrientes na drenagem pluvial e conseqüentemente poluindo os mananciais (Codd, 2000). O problema de eutrofização, principalmente por aporte excessivo de fósforo e nitrogênio, provoca mudanças na qualidade da água, onde se destacam: a maior ocorrência de florações de cianobactérias (Carmichael, 1992), redução do oxigênio dissolvido, diminuição da biodiversidade, deterioração estética do ambiente, morte de peixes e microalgas, com conseqüências negativas sobre a eficiência e custo de tratamento da água, quando se trata de manancial de abastecimento público (FUNASA, 2003). O aumento na biomassa de cianobactérias e fitoplâncton em geral, provoca aumento da turbidez e do material particulado, os quais podem flotar nos decantadores e serem carregados para os filtros, obstruindo-os depois de poucas horas de funcionamento (Codd, 2000).

Em quantidades elevadas, algumas substâncias produzidas pelas algas podem passar pelos filtros, causando gosto e odor na água tratada, além de possibilitar a formação de compostos organoclorados (Di Bernardo, 1995). Em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil, existem registros de reclamações em relação à qualidade da água potável. Cerca de metade das plantas de tratamento de água dos Estados Unidos reportam problemas com compostos que causam gosto e odor, relacionados aos metabólitos das cianobactérias, 2-metilisoborneol (MIB) e trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol (geosmina) (Westerhoff *et al.*, 2005). Estes compostos são de difícil remoção através dos métodos convencionais de tratamento água (Rittmann *et al.*, 1995).

As pesquisas que têm como objetivo analisar métodos alternativos de tratamento, que sejam mais efetivos na remoção de MIB e geosmina, em Estações de Tratamento de Água (ETAs) envolvem arraste por ar difuso e "air stripping", oxidação química, adsorção em Carvão Ativado Granular (CAG) e em Carvão Ativado em Pó (CAP) (Lalezary *et al.*, 1986; Ferreira Filho, 1996). A suscetibilidade dos compostos MIB e geosmina à degradação biológica (biodegradação) tem levado

diversos pesquisadores a estudar uma variedade de microrganismos capazes de remover estas substâncias da água, como um método alternativo na remoção de gosto e odor.

Uma ampla pesquisa americana, com consumidores de água potável, relatou que 52% dos consumidores expressam preocupação com o gosto e o odor na água (WQA, 2001). Em função dessa preocupação, têm aumentado nos últimos anos o consumo de água engarrafada para uso como bebida, em detrimento da água distribuída pela rede pública. Este fenômeno ocorre mesmo que o custo da água distribuída à população seja várias vezes menor que a água envasada. Isto ocorre principalmente devido a insegurança da população com a qualidade da água potável distribuída pelas redes de tratamento (Benetti *et al.*, 2009).

1.1 Justificativa

As cianobactérias constituem o principal grupo responsável por determinar problemas de gosto e odor em águas de abastecimento, devido ao seu potencial de liberar metabólitos, como MIB e geosmina. A ocorrência de frequentes eventos de florações desses microrganismos no Lago Guaíba, importante manancial de abastecimento da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, acompanhada de concentrações de MIB e geosmina acima do limite de detecção olfativo (LDO) têm exigido da companhia de abastecimento a aplicação de doses elevadas de CAP, encarecendo o processo de tratamento de água.

A partir da detecção dos compostos MIB e geosmina nas águas do Lago Guaíba espera-se encontrar bactérias capazes de degradar estas substâncias e que possam ser utilizadas em processos de tratamento. Neste sentido, torna-se importante conhecer a capacidade adsortiva de CAGs de diferentes materiais e procedências, com o objetivo de escolher o mais adequado para utilização em processos de tratamento, como por exemplo, filtração biológica.

1.2 Objetivo Geral

Dentro do contexto analisado, esta tese de doutorado propôs avaliar o potencial de remoção dos compostos MIB e geosmina da água, empregando CAG e degradação biológica.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade adsortiva de diferentes CAGs na remoção de MIB e geosmina, através das Isotermas de Freundlich e caracterizar os carvões em relação ao número de iodo e área superficial BET;
- Isolar bactérias capazes de degradar MIB e geosmina a partir de águas naturais e caracterizar esses microrganismos através de biologia molecular;
- Determinar a capacidade de degradação biológica dos compostos MIB e geosmina na água, na ausência de um substrato sólido.

1.3 Revisão Bibliográfica

1.3.1 Florações de cianobactérias

As cianobactérias são organismos procariontes, fototróficos, encontrados em diversos habitats, incluindo terrestre, de água doce e ambientes marinhos. O crescimento acelerado desses microrganismos, com conseqüente aumento na densidade de uma ou poucas espécies, é chamado floração (Sant'Anna *et al.* 2006).

Dentre os principais fatores que controlam a dominância das cianobactérias no ambiente aquático estão a baixa turbulência, baixa luminosidade, baixa relação de mistura na zona fótica, altas temperaturas, baixa concentração de CO₂, pH elevado, concentração de fósforo total elevada, de nitrogênio total baixo, relação N:P baixa, estratégia para estocar o fósforo, capacidade de minimizar a herbivoria e regulação da flutuação (Huszar *et al.*, 2000).

Em mananciais utilizados para abastecimento público ou recreação, as florações são definidas em relação à concentração celular, que podem causar danos à saúde pública, isto é, produção de toxinas. Pode-se quantificar a densidade e biomassa de cianobactérias diretamente pelo número de células ou de organismos, estimativa de biomassa (biovolume) ou indiretamente pela medida de clorofila *a*. Com base nesses parâmetros, alguns autores consideram floração a ocorrência de um número igual ou superior a 20.000 células de cianobactérias por mililitro (Sant'Anna *et al.* 2006).

As florações de cianobactérias podem formar manchas na superfície da água, alterando a cor, odor e o gosto da mesma. A ocorrência desses eventos, frequente nos últimos anos em todo o mundo, chega a formar densas camadas na água (Cybis *et al.*, 2006). A presença de algumas cianobactérias como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, e *Planktothrix* pode conferir gosto e odor à água, devido ao seu potencial de produzir metabólitos como MIB e geosmina, além de toxidez devido à produção de toxinas (Falconer *et al.* 1999).

As cianotoxinas podem alterar a biota aquática, resultando em efeitos tóxicos também para os mamíferos terrestres, não estando totalmente esclarecida a razão de sua produção, embora possa estar relacionada à proteção contra herbivoria e também a alelopatia, como em vegetais superiores (Sivonen e Jones, 1999). A preocupação com a saúde pública se dá pelo fato de que a intoxicação ocorre tanto

por contato em atividades de recreação, como pelo consumo de pescado contaminado ou principalmente pela ingestão oral de água sem um tratamento adequado para remoção das toxinas (FUNASA, 2003).

As toxinas estão presentes no interior da célula, sendo liberadas em situação de lise celular, decorrentes de processo de senescência natural ou pela ação de fatores ambientais. Os mecanismos de toxicidade das cianotoxinas envolvem efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos até a inibição total da síntese protéica (Sivonen e Jones, 1999). A Portaria MS nº 518 (Brasil, 2004) estabelece que a presença de cianobactérias no manancial, junto ao ponto de captação, é o parâmetro básico que desencadeia o monitoramento das cianotoxinas na água para o consumo humano. A partir da avaliação da presença e densidade das cianobactérias, os demais parâmetros previstos na legislação deverão ser implementados (Cybis *et al.*, 2006).

Atualmente são conhecidos cerca de 150 gêneros e 2.000 espécies de cianobactérias, dos quais aproximadamente 40 gêneros são descritos como produtores de toxinas, o que torna o estudo da morfologia e fisiologia desses microrganismos extremamente importante (Carmichael e Falconer 1993). Espécies do gênero *Microcystis* têm sido responsáveis por mais de 65% dos relatos de intoxicação, sendo comum casos atribuídos a *M. aeruginosa*. Florações da espécie, incluindo registros de linhagens tóxicas, foram constatadas na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, bem como em mananciais de sub-bacias da Bacia do Guaíba (Matthiensen *et al.*, 1999). No Brasil, florações de cianobactérias tornam-se cada vez mais frequentes, sobretudo em mananciais utilizados para o abastecimento público (Chaves *et al.*, 2009). Segundo Sant'Anna *et al.* (2008), no Brasil já foram identificadas 32 espécies de cianobactérias produtoras de toxinas, sendo a região subtropical do país a que apresentou a maior diversidade, 27 espécies tóxicas.

As cianobactérias estão frequentemente associadas à produção de compostos que conferem gosto e odor (MIB e geosmina) à água. Assim, existem propostas para utilizar a detecção destes compostos, através do odor e sabor característicos, como indicadores da presença de cianotoxinas na água. Entretanto, não há nenhuma evidência de que existe correlação entre a presença de toxinas e substâncias que proporcionam gosto e odor (Chorus e Bartram, 1999), uma vez que as rotas biosintéticas para esses compostos são diferentes e não relacionadas com

a síntese das cianotoxinas conhecidas (Carmichael *et al.*, 2001). Por sua vez, a falta de gosto e odor na água não implica a presença ou ausência de cianobactérias.

1.3.2 Metabólitos MIB e geosmina

As substâncias orgânicas liberadas em diferentes fases de crescimento das cianobactérias incluem proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, lipídios e compostos de baixo peso molecular (Kisand e Tammert, 2000). Entretanto, a informação da composição química e o destino dos exudatos das algas ainda não são totalmente conhecidos. Uma grande quantidade dos materiais liberados são carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos que podem servir de substrato para os microrganismos heterotróficos (Puddu *et al.*, 2003) e contribuir para os eventos de gosto e odor em águas de abastecimento (Izaguirre *et al.*, 1982).

Os metabólitos MIB e geosmina são álcoois terciários (Figura 1) com função biológica ainda não definida, embora eles possam ser subprodutos ou produtos intermediários da produção de pigmentos (Bafford *et al.*, 1993, Zimba *et al.*, 1999). Esses compostos liberam cheiro e gosto de terra e mofo na água (Ho *et al.*, 2007), sendo liberados normalmente no final da primavera e verão (período de floração de cianobactérias), em concentrações de 100 ng/l, consideradas altas, e de 10 ng/l, relatadas como baixas, porém já perceptíveis como odores desagradáveis (Terauchi *et al.*, 1995, Lauderdale *et al.*, 2004). A fórmula química do composto MIB é $C_{11}H_{20}O$ e da geosmina, $C_{12}H_{22}O$ (Lalezary *et al.*, 1986).

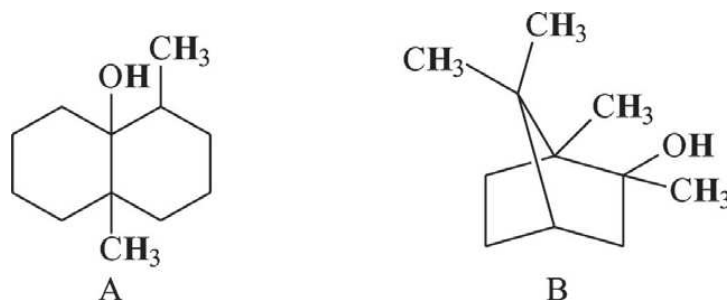


Figura 1: Estrutura química dos compostos MIB (A) e geosmina (B) (Fonte: Freitas *et al.*, 2008).

O composto MIB foi primeiramente identificado por Medsker e colaboradores em 1968 e a geosmina caracterizada como um produto de culturas de actinomicetes

por Greber e LeChevallier em 1965 (Huang *et al.*, 1996). A função do composto MIB na célula ainda não está totalmente compreendida, sendo que este composto pode simplesmente ser um subproduto dos processos fotossintéticos. Após o composto ser sintetizado, pode ser encontrado nas membranas do tilacóide, nas proteínas citoplasmáticas ou ser excretado pela célula (Juttner *et al.*, 1995).

Várias espécies de diferentes gêneros de cianobactérias também são capazes de produzir odor de terra ou de mofo, como: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Schizothrix* e *Symploca* (Falconer *et al.*, 1999). A espécie *Microcystis*, que normalmente apresenta cheiro de capim ou grama, quando se encontra em estado de decomposição pode apresentar forte cheiro característico de esgoto séptico (Branco, 1978). Segundo Hosaka *et al.* (1995), a produção de MIB pode variar dependendo da cepa de cianobactéria. Algumas espécies como *Oscillatoria* sp3 e *Phormidium tenue* demonstraram uma relação proporcional entre o número de filamentos ou células da cianobactéria e a concentração de MIB. Um único filamento de *Oscillatoria* sp3 produz, em média, 19,5 pg de MIB. Assim, pode-se concluir que o aumento da eutrofização em mananciais de abastecimento, favorece as florações de cianobactérias, aumentando a liberação dos compostos causadores de gosto e odor nas águas superficiais.

A relação do composto MIB com a ocorrência de gosto e odor de terra e mofo na água é bem documentada na literatura (Izaguirre *et al.*, 1988a). Desde 1970, episódios de MIB que alteraram a qualidade da água têm sido reportados nos Estados Unidos (Rosen *et al.*, 1970), Holanda (Piet *et al.*, 1972) e Japão (Yagi *et al.*, 1983), bem como causaram gosto de terra em peixes cultivados comercialmente (Yurkowski e Tabachek, 1980). Suffet *et al.* (1996) relataram problemas de gosto e odor em regiões como a Ásia, Austrália, América do Norte e Europa. Segundo Ferreira Filho (1996), pesquisas realizadas pela "American Water Works Association" (AWWA) mostraram que o odor e o sabor são os principais parâmetros para a aceitação da água distribuída à população.

A tabela 1 mostra as concentrações dos compostos MIB e geosmina na água, documentadas em diferentes regiões do mundo.

Tabela 1: Registro das concentrações dos compostos MIB e geosmina em águas naturais.

MIB (ng/l)	geosmina (ng/l)	Região	Referência Bibliográfica
x	60 - 204	Rio Llobregat, Mediterrâneo	Vilalta <i>et al.</i> (2004)
> 20 - 209	> 20 - 249	Lago Kasumigaura, Japão	Sugiura <i>et al.</i> (2004)
x	16,1 - 110	Rio Llobregat, Barcelona, Espanha	Bláha <i>et al.</i> (2004)
20 - 50	x	Reservatórios, Phoenix, Arizona	Westerhoff <i>et al.</i> (2005)
63	750	Lago Diamond Valley, California	Izaguirre e Taylor (2007)
0 - 103,4	0 - 20	Lago Dianchi, China	Li <i>et al.</i> (2007)
2 - 30	x	Reservatórios, Taiwan	Yen <i>et al.</i> (2007)
0 - 16,8	0 – 90,3	Reservatórios, Austrália	Uwins <i>et al.</i> (2007)
10 - 200	> 10	Reservatórios, Taiwan	Tung <i>et al.</i> (2008)

Os trabalhos publicados que registram concentrações de MIB e geosmina em águas naturais são limitados no Brasil, provavelmente devido aos custos e complexidade das técnicas analíticas (cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa) para a identificação e quantificação desses compostos. No período de janeiro a abril de 2004, no Lago Guaíba, importante manancial de abastecimento de água da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, ocorreu um episódio marcante de floração de cianobactérias, onde as concentrações de MIB na água bruta chegaram a 1.985 ng/l e na água tratada 838 ng/l (Bendati *et al.*, 2005). Uma vez que o LDO para MIB é da ordem de 10 ng/l, a água distribuída à população apresentava forte gosto e odor. Já nos anos de 2007 e 2008, Stefens *et al.* (2008) registraram concentração máxima de 713 ng/l de MIB em 2008 e 7 ng/l de geosmina em 2007.

Os métodos de remoção destes compostos, abaixo dos níveis de detecção, ainda são caros e, atualmente, ineficientes (Uwins *et al.*, 2007). Em alguns casos, o processo de tratamento convencional pode provocar o rompimento das células das cianobactérias, resultando em uma liberação adicional dos metabólitos intracelulares (Pietsch *et al.*, 2002). Por isso, estes compostos estão recebendo atenção das companhias de abastecimento em todo o mundo, visto que podem alterar a qualidade das águas (Ho *et al.*, 2007).

1.3.2.1 Efeitos na saúde humana

A presença de gosto e odor na água potável, em geral, é considerada um problema estético, não ocasionando riscos à saúde humana. Isso se reflete nos padrões de potabilidade, para gosto e odor, estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Benetti *et al.*, 2009). Esta avalia que a aceitabilidade de uma água potável é geralmente afetada por aspectos organolépticos antes que ela apresente concentrações tóxicas que possam colocar em risco a saúde dos consumidores (WHO, 2004). É importante salientar que alguns contaminantes podem ser, ao mesmo tempo, tóxicos e causarem gosto e odor.

Segundo Joe *et al.* (2007), os compostos MIB e geosmina não são nocivos para a saúde humana, causando somente desconforto estético. Entretanto, o estudo realizado por Huang *et al.* (2007) demonstra que os extratos liberados por culturas de *Anabaena*, *Microcystis* e *Oscillatoria*, contendo estes compostos, entre outros, têm atividade mutagênica, existindo a necessidade de identificar precisamente todos os compostos através de análises químicas e toxicológicas. Os trabalhos de Höckelmann *et al.* (2004) e Mochida (2009) consideram muito baixa a toxicidade dos compostos MIB e geosmina aos seres humanos, porém com efeitos tóxicos sobre outras espécies. Enquanto não há consenso em relação aos impactos provocados à saúde, os odores e gostos causados por MIB e geosmina podem originar efeitos psicossomáticos, como dores de cabeça, estresse ou problemas estomacais (Young *et al.*, 1996), não devendo ser minimizados pelas autoridades responsáveis pela saúde pública (Benetti *et al.*, 2009).

1.3.2.2 Métodos analíticos de detecção de MIB e geosmina

Os métodos de análise e preparação das amostras de MIB e geosmina como extração Líquido-Líquido, *Purge & Trap* e análise de *Closed-Loop Stripping* (extração em fase gasosa) consomem muito tempo e/ou requerem espectrofotômetros de massa de alta resolução e um volume grande de amostra (Lloyd *et al.*, 1998). Considerando que MIB e geosmina são encontrados em concentrações muito baixas em amostras de água, a detecção e a análise quantitativa destes compostos requerem técnicas complexas e métodos analíticos que dispendem muito tempo (Watson *et al.*, 2000). Desta forma, o método de

microextração em fase sólida (SPME) pode ser utilizado em conjunto com a cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massa (GCMS) na detecção de níveis baixos (ng/l) de MIB e geosmina, sem a necessidade de se processar grandes volumes de amostras. Além disto, a combinação de SPME e GCMS é um método rápido para análise de compostos voláteis e não voláteis presentes no “*headspace*” das matrizes de água (Eisert e Levsen, 1996).

1.3.3 Tratamento de água: remoção de gosto e odor

Os processos de tratamento usados na remoção de gosto e odor se classificam em duas categorias, os que destroem ou modificam os compostos e os que removem os compostos da água (Hoehn e Malleaville, 1995 *apud* Benetti *et al.*, 2009). Processos de oxidação enquadram-se no primeiro grupo, enquanto aeração e adsorção em carvão ativado pertencem ao segundo. Os processos biológicos incluem mecanismos de remoção de gosto e odor através de transformação e remoção, classificando-se em ambas as categorias (Benetti *et al.*, 2009).

Segundo Sugiura *et al.* (2003), ocorreram cerca de 20 milhões de reclamações envolvendo a água de abastecimento somente no ano de 1993 no Japão, refletindo a dificuldade de remoção dos compostos MIB e geosmina pelos métodos convencionais de tratamento. Diversos estudos têm buscado melhorar a qualidade da água, desenvolvendo novos métodos para as companhias de abastecimento. Os tratamentos que utilizam a oxidação, sendo baseados na adição de cloro e permanganato de potássio ou o uso de ozonização têm sido comumente empregados, não sendo totalmente eficientes para remoção de MIB e geosmina (Ho *et al.*, 2002). Além disso, estas metodologias podem causar sérios problemas como o aumento da liberação de compostos organoclorados, como os trihalometanos (THM), sendo os peróxidos suspeitos de serem carcinogênicos (Sugiura *et al.*, 2003).

A seleção dos processos de tratamento mais adequados, bem como os pontos de aplicação de produtos químicos são otimizados através de ensaios em planta piloto e jarrestes, uma vez que as características da água de abastecimento têm grande influência na efetividade dos processos de tratamento (Di Bernardo e Dantas, 2005). O método convencional de tratamento é utilizado na produção de água tratada a partir de águas brutas de mananciais superficiais, expostas a

diversas fontes de poluição. As ETAs que utilizam esta tecnologia apresentam as seguintes etapas de tratamento: coagulação, floculação, sedimentação e filtração antes do acondicionamento final nos reservatórios, para posterior distribuição à população (Di Bernardo e Dantas, 2005).

A etapa de coagulação é bastante rápida e consiste na adição de produtos químicos, denominados coagulantes, à água. Os mais utilizados são o sulfato de alumínio, cloreto férrico e policloreto de alumínio dependendo das características físico-químicas da água bruta e do desempenho da ETA. Esta etapa tem a finalidade de unir as partículas presentes na água (matéria orgânica, colóides, células de algas e cianobactérias) que apresentam carga elétrica superficial negativa. Em contato com a água, o coagulante reage, formando espécies hidrolisadas, com carga elétrica superficial positiva, permitindo a união das partículas por atração de cargas opostas. A floculação ocorre na unidade de mistura lenta da ETA, após a coagulação. As substâncias coloidais, matéria orgânica e os microrganismos, anteriormente unidos, continuam se agregando e formando flocos de impurezas. A mistura lenta permite que os flocos se choquem com as impurezas presentes na água, formando flocos grandes e densos que sedimentam por gravidade. A etapa seguinte é denominada de sedimentação e ocorre nos decantadores da ETA. É um fenômeno físico onde os flocos, formados na floculação, apresentam movimento descendente, devido à ação da gravidade. A remoção desses flocos proporciona a clarificação da água e acúmulo das impurezas no fundo dos decantadores. Após a sedimentação ocorre a etapa de filtração, onde a água escoar através de um meio granular, podendo ser de areia ou areia e antracito, presente nos filtros rápidos. Esse processo consiste em remover partículas suspensas e coloidais e microrganismos que permaneceram no sobrenadante que passa dos decantadores para os filtros. Após a filtração ainda ocorre a desinfecção da água através da adição de substâncias químicas, principalmente à base de cloro, para inativar e eliminar a maioria dos microrganismos patogênicos que ainda estão presentes na água. Por último, ocorre a fluoretação e, se necessário, a correção do pH (Di Bernardo e Dantas, 2005).

Os metabólitos MIB e geosmina, particularmente na forma dissolvida (extracelular), mostram-se recalcitrantes aos métodos convencionais de tratamento de água (Nerenberg *et al.*, 2000; Rittmann *et al.*, 1995), sendo de difícil remoção por coagulação-sedimentação e em filtros de areia rápidos (Tanaka *et al.*, 1996). Os métodos de aeração em aerador tipo cascata e torre de dessorção gasosa, filtração

em membrana de nanofiltração e oxidação química para remoção de gosto e odor em processos de tratamento de água foram investigados por Benetti *et al.* (2009), durante a pesquisa realizada para o Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (PROSAB 5 -Tema 1 – Água).

Os processos de aeração em aerador tipo cascata e torre de dessorção gasosa não apresentaram resultados satisfatórios, no sentido de atingir uma significativa redução de MIB e geosmina da água. Isto se deve ao fato destes compostos serem semivoláteis, de acordo com os valores de suas constantes de Henry. Entretanto, os sistemas de aeração foram eficientes para a redução dos compostos como o sulfeto de hidrogênio. A filtração em membrana de nanofiltração apresentou eficiências superiores a 95% de remoção de MIB e geosmina, podendo ser considerado um ótimo resultado. Outros compostos orgânicos dissolvidos também poderão se beneficiar da nanofiltração, considerando o baixo peso molecular de corte das membranas. Nos estudos de oxidação química, os três oxidantes testados, permanganato de potássio, hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato de sódio apresentaram pouca capacidade para a oxidação de MIB e geosmina, uma vez que estes compostos são álcoois terciários, apresentando certa resistência à oxidação. A constante investigação sobre a eficiência de diferentes técnicas de tratamento de água, na remoção das mais variadas substâncias, favorece não só o conhecimento a respeito do composto alvo da pesquisa, mas também amplia as informações na área de saneamento.

As metodologias empregadas na remoção de MIB e geosmina apresentam elevado custo operacional (Terauchi *et al.*, 1995), sendo que a adsorção em carvão ativado (CA) vem sendo cada vez mais utilizada pelas companhias de abastecimento na remoção de compostos orgânicos e inorgânicos (Di Bernardo e Dantas, 2005). O uso de CA no tratamento de água pode ser sob a forma de CAP ou CAG, dependendo da ETA e das condições da água bruta. Atualmente existe uma grande variedade de carvões sendo fabricados e comercializados (Brandão e Silva, 2006), sendo que a escolha da aplicação do CAP ou CAG é baseada nos fatores técnico-econômicos, de funcionalidade operacional da ETA e de aspectos cinéticos envolvidos no processo de adsorção (Ferreira Filho, 1996).

A adsorção em CA é amplamente aceita como uma tecnologia avançada para remover muitos poluentes e objetivamente compostos que causam odor na água,

sendo que o CAG apresenta resultados mais satisfatórios que o CAP para a operação em filtros de carvão (Vinitnantharat *et al.*, 2007). O uso de CAP tem a flexibilidade de ser aplicado quando necessário. Entretanto, quando os problemas de gosto e odor permanecem por muito tempo e é preciso utilizar doses elevadas de carvão, pode ser mais viável economicamente empregar adsorção em CAG (Chen *et al.*, 1997). Com um projeto adequado e uma boa manutenção, o sistema de adsorção em CAG pode ser operado efetivamente por vários anos em situações de concentração baixa a moderada de compostos causadores de gosto e odor, antes de se fazer a troca do carvão (Graese *et al.*, 1987).

Ashitani *et al.* (1988) mostraram que as plantas de tratamento de água da cidade de Osaka (Japão) utilizam métodos convencionais de tratamento, os quais incluem pré-cloração, coagulação, sedimentação, filtros de areia rápidos e pós-cloração. O lago que abastece as estações de tratamento vem sofrendo problemas de gosto e odor por MIB e geosmina, associados à presença das cianobactérias *Anabaena macrospora* e *Phormidium tenue*. Estes compostos não foram removidos pelos métodos convencionais de tratamento, mesmo com a adição de CAP na dose de 10 a 20 mg/l. Assim, este estudo avaliou o efeito do tratamento convencional na remoção de MIB e geosmina. A taxa de redução dos compostos por métodos convencionais, juntamente com a adição de CAP, foi de 40%. Os compostos MIB e geosmina foram detectados tanto em solução como na forma suspensa, associados à presença de cianobactérias. Estes compostos na forma suspensa foram bem removidos por coagulação e sedimentação, sendo que a aplicação de pré-cloração provocou a liberação adicional dos metabólitos, presentes nas cianobactérias, para a água.

Ahn *et al.* (2007) relataram que as companhias de tratamento de água da região metropolitana de Seul (Coréia) planejam introduzir processos avançados de tratamento para remoção de gosto e odor, provocados pelas algas e outros microrganismos, visto que as metodologias atuais de tratamento não são totalmente eficientes. Para esta implantação foi necessário obter informações práticas sobre a eficiência do processo a ser empregado. Assim, a remoção foi avaliada por diferentes processos: adição de CAP, ozonização, tratamento em CAG e um processo de oxidação avançado. Os experimentos foram conduzidos em escala de laboratório e piloto e a concentração de MIB e geosmina utilizada foi de 15 ng/l. Os resultados indicaram que durante os episódios de gosto e odor, somente a

ozonização e a aplicação de CAP isoladamente não foram suficientes para a remoção de MIB e geosmina abaixo de 15 ng/l. Porém, estas metodologias aplicadas como pré-tratamento junto com a utilização de CAG forneceram uma boa remoção dos compostos.

Os processos de tratamento como pré e pós-cloração, coagulação e sedimentação podem remover as concentrações de geosmina abaixo do LDO, não ocorrendo o mesmo com o composto MIB (Lauderdale *et al.*, 2004). Assim, torna-se necessário encontrar novos processos de remediação de gosto e odor, principalmente em águas utilizadas como mananciais de abastecimento público e onde existem registros de florações de cianobactérias.

1.3.3.1 Carvão ativado

O CA é um tipo de material carbonáceo, caracterizado por possuir área superficial interna elevada e porosidade altamente desenvolvida (Coutinho *et al.*, 2000), de forma a possibilitar a adsorção de moléculas tanto em fase líquida como gasosa. O CA pode ser obtido de diversas matérias primas como madeira, casca de coco, sementes, osso, coque, petróleo, plástico, pneus, entre outros (Brandão e Silva, 2006). O material utilizado na produção do carvão e a forma de ativação produzem carvões ativados com estrutura interna e distribuição de tamanho de poros diferentes, proporcionando distintas capacidades adsorptivas (Di Bernardo e Dantas, 2005). A fabricação do CA envolve dois processos principais: a carbonização da matéria-prima, que consiste no tratamento térmico do material em atmosfera inerte a elevada temperatura, iniciando a formação da estrutura interna porosa dos grãos e ativação desse produto em atmosfera redutora, onde o gás carbônico que se difunde pelo carvão abre novos poros e forma a estrutura porosa final do CA (Swiatkowski, 1998).

Os grãos de CA podem apresentar diferentes tipos de poros, os quais são classificados de acordo com seu diâmetro médio: microporos primários (menor que 1,2 nm), microporos secundários (entre 1,2 e 2 nm), mesoporos (entre 2 e 50 nm) e macroporos (maior que 50 nm). O conhecimento da área superficial e a distribuição do volume dos poros são fundamentais para avaliar a eficiência de adsorção do CA, visto que a máxima adsorção é proporcional ao tamanho da área superficial dentro dos poros que estão acessíveis para que ela ocorra (Kuroda *et al.*, 2005). A

superfície BET (m^2/g), calculada de acordo com a equação da isoterma de adsorção de nitrogênio (relação entre a quantidade adsorvida por unidade de peso do adsorvente), é uma das maneiras mais usuais de expressar a superfície interna de um CA.

A avaliação da capacidade adsortiva do CA, isto é, a quantidade de substância que o CA acumula, pode ser realizada utilizando diferentes índices: o Número de Melaço ou Índice de Descoloração que avalia a capacidade do CA na remoção de moléculas com grande massa molar; o Índice de Fenol determina a quantidade de CA necessária para reduzir 100 mg de fenol a 10 mg em solução aquosa; o Índice de Azul de Metileno está relacionado com a área superficial dos poros maiores que 1,5 nm e o Número de Iodo relaciona-se com a adsorção de moléculas de pequena massa molecular (Di Bernardo e Dantas, 2005).

Segundo Kuroda *et al.* (2005), a capacidade adsortiva do CA em relação a um determinado contaminante depende de fatores intrínsecos do adsorvente, como: volume e distribuição de poros, forma de poros, existência de grupos funcionais de superfície, pH, teor de cinzas, entre outros. No entanto, as condições experimentais como temperatura, tempo de contato, agitação e presença de compostos que competem pelos mesmos sítios de adsorção, atuam diretamente na eficiência da adsorção, podendo facilitar ou dificultar o processo.

De acordo com Donati *et al.* (1994) e Di Bernardo e Dantas (2005), a capacidade adsortiva de um CA é melhor avaliada através dos parâmetros: número de iodo, índice de azul de metileno, distribuição de tamanhos e área superficial dos poros. Entretanto, é preciso tomar cuidado, pois estes parâmetros avaliados isoladamente são muito específicos e não devem ser usados como indicadores gerais da eficiência dos CAs. Assim, a determinação das isotermas de adsorção para remoção de uma determinada substância da água é o melhor indicador da potencialidade de um CA. Gillogly *et al.* (1999) também citaram que somente a determinação das características físicas do carvão, como área superficial e volume de microporos, não são suficientes para determinar, *a priori*, a sua capacidade de remoção. Assim, a dose de carvão necessária para mitigar um problema de contaminação por partículas orgânicas em águas de abastecimento geralmente depende da capacidade de adsorção do carvão e das características da água. Infelizmente, a capacidade adsortiva é dependente da concentração inicial do contaminante, a qual pode apresentar grande variação. Assim, é necessário um

grande volume de dados para caracterizar os sistemas, o que é difícil de obter devido à complexidade de análise dos compostos MIB e geosmina.

Um dos maiores problemas enfrentados nos sistemas de tratamento de água para remoção de MIB e geosmina, que utilizam CA, é a presença de matéria orgânica dissolvida (Cook *et al.*, 2001). A matéria orgânica (MO) não está presente somente em concentrações mais elevadas que os compostos que causam gosto e odor, mas em frações variadas, que podem reduzir a adsorção destes compostos em CA. Isso ocorre devido ao bloqueio dos poros ou por mecanismos de adsorção competitivos, isto é, quando o peso molecular da substância competidora for elevado poderá vir a bloquear os poros, ou quando seu peso molecular for baixo poderá competir diretamente pelos sítios de adsorção, impedindo a remoção de compostos causadores de gosto e odor (Hepplewhite *et al.*, 2004). Na prática, esses dados indicam que é preciso aumentar significativamente a dose de CAP a ser empregada nas estações de tratamento, bem como pode ocorrer a redução do tempo de vida dos filtros que utilizam CAG (Ho *et al.*, 2007).

Hepplewhite *et al.* (2004) investigaram a capacidade de adsorção de MIB a partir de dois CAs na presença de soluções contendo 13 tipos de MO. Os resultados mostraram a dificuldade de remoção dos compostos causadores de gosto e odor na presença de MO e indicou que a competição entre a MO e MIB pode ser atribuída ao tamanho e a estrutura similar desses compostos. O baixo peso molecular da MO foi o fator mais competitivo com a molécula de MIB pelos sítios de adsorção do carvão. Assim, a produção de um carvão que minimize o efeito competitivo parece problemática. Na prática, um CAP com uma distribuição de tamanho de poros restrita, que permite somente a adsorção de MIB, e o mínimo acesso a MO de baixo peso molecular geram elevados custos de produção. Para os autores, um carvão ideal para adsorção de MIB deve ter uma distribuição de poros com elevado volume de microporos, representando uma elevada adsorção, e também moderado volume de mesoporos, permitindo rápido acesso aos sítios de adsorção, enquanto minimiza o bloqueio dos poros e restringe a MO de baixo peso molecular.

1.3.3.1.1 Carvão Ativado em Pó

A adsorção por CAP pode ser utilizada como alternativa para as ETAs já em operação, pois pode ser aplicado diretamente na água, não exigindo a construção de novas instalações para implantação de filtros de CAG. Outra vantagem é que pode minimizar os problemas de gosto e odor e remover toxinas da água, quando ocorrem eventos sazonais de florações de cianobactérias (Donati *et al.*, 1994). Os pontos mais comuns de aplicação são: após a captação da água bruta, na unidade de mistura rápida (coagulação) ou na entrada dos filtros (Brandão e Silva, 2006). O CAP, quando misturado à água, entra em contato com as partículas orgânicas que devem ser removidas pelo processo de adsorção. Após o tempo de contato, o CAP deve ser removido da água, o que pode ser feito junto com o lodo dos decantadores ou durante a lavagem dos meios filtrantes, dependendo do ponto de aplicação do CAP na ETA.

1.3.3.1.2 Carvão Ativado Granular

A adsorção por CAG no tratamento de água ocorre sob a forma de meios filtrantes em tanques ou filtros, onde a água permeia. Os compostos químicos presentes na água cobrem a superfície dos poros do CAG, por adsorção, até que o carvão fique saturado e não tenha mais capacidade de reter as substâncias. Por isso, o CAG precisa ser retirado do filtro, reativado ou substituído por um carvão novo. O CAG pode ser utilizado como etapa de filtração/adsorção em que a filtração ocorre combinada à adsorção ou, mais comumente, como pós-adsorção, sendo o filtro de CAG colocado depois da filtração rápida, fazendo com que a água já filtrada passe pelo CAG somente para remover compostos orgânicos dissolvidos (Brandão e Silva, 2006).

A investigação de dois métodos de tratamento de água para remoção de compostos que causam gosto e odor foi conduzida por Kim *et al.* (1997). Neste estudo foram utilizadas duas plantas de tratamento de água, uma combinando os métodos convencionais com CAG e pós ozonização e outra com os métodos convencionais e CAG. Os resultados indicaram que o tratamento convencional juntamente com as torres de carvão granular e pós ozonização foram eficientes no controle de problemas de gosto e odor. Todas as substâncias analisadas, incluindo

MIB e geosmina, puderam ser removidas para concentrações abaixo do LDO, quando o tempo de contato foi maior que 15 minutos, levando em consideração o número de iodo do CAG.

1.3.3.1.3 Isotermas de adsorção

A efetiva aplicação de CA em ETAs tem exigido o desenvolvimento de modelos matemáticos complexos, calibração, experimentação, testes extensivos de tentativa e erro, treinamento de pessoal e tempo, o que muitas vezes se torna um fator crítico. Pesquisadores têm tentado desenvolver e modificar estas teorias e modelos para prever a capacidade adsorvativa dos materiais para uma variedade de contaminantes (Gilligly *et al.*, 1999). Trabalhos recentes têm mostrado que o estudo das isotermas associado ao conhecimento das características do carvão pode ser suficiente para produzir a informação necessária e assim determinar a viabilidade do adsorvente (Müller *et al.*, 2009).

A adsorção, como utilizada em tratamento de água, é o processo de transferência de um ou mais constituintes (adsorvato) de uma fase fluida para a superfície de uma fase sólida (adsorvente – carvão ativado). No processo de adsorção as moléculas presentes na fase fluida são atraídas para a zona interfacial devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente, sendo o carvão um dos mais utilizados em tratamento de água (Coelho *et al.*, 2005). A eficiência de adsorção do CA comercial e a estimativa de viabilidade econômica para aplicação em ETAs podem ser avaliadas através de ensaios que determinem sua isoterma de adsorção (Ng *et al.*, 2002).

As isotermas de adsorção são representações gráficas que mostram a relação entre a quantidade adsorvida por unidade de peso do adsorvente, no caso, o CAG (Ng *et al.*, 2002). As isotermas são utilizadas para testar a capacidade de remoção de compostos orgânicos em água, selecionar o melhor adsorvente em relação a outros, estimar a sua vida útil (Oxenford e Lynkins Jr., 1989) e verificar a viabilidade econômica da aplicação comercial de um determinado carvão para um contaminante específico (Ng *et al.*, 2002). Um modelo matemático simples que descreve a quantidade de adsorvato por unidade de adsorvente é a Isoterma de Langmuir, usada para descrever processos de adsorção monocamada. Esta

equação é baseada na cinética de adsorção e pressupõe uma superfície uniforme, uma única camada de material adsorvido e temperatura constante (Ng *et al.*, 2002).

As isotermas também podem ser manipuladas na forma de equações matemáticas, representativas do modelo de adsorção de Freundlich, já utilizadas em outros estudos (Chen *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2005; Brasil e Brandão, 2005; Kuroda *et al.*, 2005). A equação de Freundlich é empírica e muito utilizada visto que descreve com precisão os dados de ensaios de adsorção (Di Bernardo e Dantas, 2005), motivo pelo qual este modelo foi utilizado no presente estudo. Segundo Ng *et al.* (2002), os principais fatores que determinam a forma da isoterma são o número de substâncias em solução e suas capacidades adsorptivas, a concentração inicial em solução, o grau de competição entre as substâncias pelos sítios de adsorção e as características do CA.

A Isoterma de Freundlich foi utilizada como modelo de adsorção para comparar a eficiência de diferentes CAs no trabalho de Ng *et al.* (2002). Neste estudo, como em outros, também foi citada a importância de utilizar água livre de compostos competidores (água destilada ou deionizada) durante o processo de adsorção, resultando em dados de maior comparabilidade e reprodutibilidade. Entretanto, como recomendação os autores indicam a necessidade de mais estudos para confirmar se os resultados obtidos sob estas condições poderiam ser aplicáveis, quando se utiliza água contendo matéria orgânica ou cloro.

Chen *et al.* (1997) avaliaram a remoção de MIB, visto que este composto foi mais difícil de remover quando comparado a outros como a geosmina. Para isso, foram utilizados quatro tipos de CAGs e avaliado o número de iodo e Isotermas de Freundlich. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se água sem interferentes, como MO, a fim de se obter dados que possam ser posteriormente comparados. Em dois experimentos a concentração inicial de MIB (800 e 1200 ng/l) foi constante, com doses variadas de carvão, e em outro utilizaram concentrações variáveis de MIB (100 a 1200 ng/l) e dose constante de carvão de 1,0 mg/l. Também foi utilizada água natural para estudar a competição de outros compostos na remoção de MIB. Outro experimento importante foi à determinação do tempo de equilíbrio, isto é, o tempo necessário para alcançar o equilíbrio de adsorção, fator que pode alterar a eficiência de remoção. Dentre os carvões testados o que apresentou a maior capacidade de adsorção foi o betuminoso, seguido do de turfa, lignina e madeira nos experimentos com água sem interferentes. Nesse mesmo grupo de testes não foi verificada

nenhuma diferença entre os resultados, desconsiderando uma possível competição quando se usa uma dose variada de MIB. Assim, a isoterma obtida com água livre de competidores representou mais precisamente os resultados para os carvões testados sob essas condições de estudo. É importante salientar que um único teste como número de iodo foi inconsistente para avaliar a capacidade de remoção de um CA. Assim, os dados das isotermas de Freundlich foram mais eficientes para avaliar o poder de adsorção de diferentes carvões, nas condições deste estudo. Cabe ressaltar a identificação de duas fontes de adsorção competitiva: compostos orgânicos hidrofóbicos dissolvidos e matéria orgânica natural dissolvida, os quais reduziram a capacidade de adsorção do carvão. Vinitnantharat *et al.* (2007) investigaram se a capacidade de adsorção de um CA com sua superfície modificada por uma camada de quitosana apresentava maior adsorção que um carvão sem modificação. Para isso, foram utilizados carvões de casca de coco e carvão vegetal betuminoso e os resultados analisados através da constante experimental K_f , a partir das Isotermas de Freundlich. Os resultados deste estudo mostraram que o carvão vegetal betuminoso, com a superfície modificada, foi o que apresentou a maior capacidade de adsorção, seguido do carvão betuminoso sem modificação. Para o carvão de casca de coco com e sem modificação na superfície, os resultados não indicaram diferenças significativas, mostrando que a quitosana poderia aumentar a capacidade de remoção de geosmina para determinados CAGs. Este estudo mostrou novamente que a análise das curvas traçadas a partir das concentrações de MIB e geosmina adsorvidas versus a concentração de MIB e geosmina remanescentes é válida para medir a capacidade de adsorção de diferentes CAs.

1.3.4 Degradação biológica dos compostos MIB e geosmina

O uso de CAP tem se mostrado efetivo na remoção de MIB, porém exigindo elevados custos de tratamento, quando os problemas de gosto e odor permanecem por um tempo prolongado (Lauderdale *et al.*, 2004). A suscetibilidade dos compostos MIB e geosmina à degradação biológica (biodegradação) tem levado diversos pesquisadores a estudar uma variedade de microrganismos capazes de remover estas substâncias da água, como um método alternativo na remoção de gosto e odor. Essa suscetibilidade pode ser atribuída às estruturas químicas de MIB e

geosmina, que são similares aos álcoois alicíclicos e as cetonas (Rittmann *et al.*, 1995).

Algumas bactérias aquáticas são capazes de degradar MIB e geosmina, onde foi constatado que o *operon* CAM, grupo de genes que constitui uma unidade reguladora ou de controle, inclui os genes primários responsáveis pela biodegradação desses álcoois (Izaguirre *et al.*, 1999). A cinética da biodegradação dos metabólitos de algas em sistemas de tratamento de água vem sendo avaliada e modelada (Nerenberg *et al.*, 2000), embora ainda se tenha pouco conhecimento sobre a degradação de MIB e geosmina em reservatórios de abastecimento de água (Westerhoff *et al.*, 2005).

A via da biodegradação do composto MIB pode ser similar à via da cânfora, uma cetona bicíclica a qual tem sido documentada como biodegradável por espécies de *Pseudomonas* e por *Mycobacterium rhodochrous*, através da reação biológica Baeyer-Villiger (Ho *et al.*, 2006). Schumann e Pendleton (1997) confirmaram que os maiores produtos da degradação de MIB eram 2-metilenobornano, 2-metilcanfeno e uma pequena quantidade do alcano endocíclico 2-metil-2-bornano, através de análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e GC-MS. Outros produtos da degradação de MIB foram anteriormente identificados, de forma incorreta, como únicos produtos da degradação de MIB, 2-metilenobornano e 2-metil-2-bornano, por Lapalme *et al.* (1979), Martin *et al.* (1988) e Sumitomo (1992).

Na biodegradação de MIB, as estruturas em anel da cânfora são clivadas através de uma sequência de reações intermediárias as quais são catalisadas por enzimas monoxigenases, resultando na formação de lactonas (ésteres cíclicos) instáveis. O estudo de Oikawa *et al.* (1995) confirmou os processos anteriores através da excisão completa do *operon* CAM de uma espécie de *Pseudomonas* que degrada cânfora e a subsequente inserção em *Escherichia coli* capacitando a degradação de MIB por esta bactéria.

A biodegradação do composto geosmina ainda não foi elucidada por nenhuma via definitiva. Entretanto, Saito *et al.* (1999) foram capazes de identificar quatro possíveis produtos da biodegradação, dois dos quais foram identificados como 1,4a-dimetil-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidronaftaleno e enona. Estes dois produtos também têm sido usados na síntese química da (-)-geosmina (Saito *et al.*, 1996). É possível que este composto seja biodegradado por uma via similar ao do composto ciclohexanol. Cadeias de *Acinetobacter* e *Nocardia* foram capazes de degradar o

ciclohexanol através de enzimas monoxigenases, similar a reação biológica de Baeyer-Villiger (Trudgill, 1984 apud Ho *et al.*, 2006). O ciclohexanol é inicialmente oxidado em uma cetona alicíclica, onde a inserção de um átomo de oxigênio no anel, através de uma enzima monoxigenase, resulta em uma lactona instável, que é hidrolisada em um diácido.

Um dos primeiros trabalhos a relatar a degradação biológica de compostos causadores de odor foi publicado por Silvey *et al.* (1964). Narajan e Nunez (1974) mostraram que organismos isolados em um meio de cultura sólido, incluindo *Bacillus cereus* e *B. subtilis*, rapidamente degradaram geosmina. Em 1975 foi demonstrada a capacidade de degradação de uma amostra pura de geosmina por filtração, onde a cultura de *B. cereus* removeu 81% do composto, após o tempo de incubação (Silvey *et al.*, 1975). Posteriormente, Namkung e Rittmann (1987) reportaram a remoção de MIB por um biofilme em condições de fluxo contínuo de operação, utilizando concentrações de 100 e 1000 µg/l de MIB. A remoção foi de 40 e 17%, respectivamente, em um período de 2 a 3 horas.

A utilização de microrganismos para oxidação da matéria orgânica biodegradável ocorre em reatores de biomassa aderida, em leito fixo ou fluidizado, como por exemplo, filtros lentos de areia, carvão ativado granular e reatores de manta de lodo (Benetti *et al.*, 2009). Sistemas de tratamento biológico são bastante efetivos quando as condições de crescimento dos microrganismos são conhecidas, além da manutenção do pH e temperatura adequados (Egashira *et al.*, 1992). Infelizmente, enquanto alguns microrganismos capazes de degradar MIB têm sido parcialmente caracterizados, as características de crescimento e exigências ambientais não têm sido claramente definidas (Ishida e Miyaji, 1992).

Esses problemas, provavelmente incentivaram o trabalho de Izaguirre *et al.* (1988b), que isolaram e identificaram as bactérias responsáveis pela degradação de MIB, determinando o potencial de remoção deste composto. Esses microrganismos foram cultivados em meio mineral (MM), com concentrações de MIB na faixa de mg/l inoculados com água e sedimento do Lago Perris, Califórnia, o qual sazonalmente apresenta episódios de gosto e odor. A degradação de MIB ocorreu em concentrações de µg/l e mg/l em um período de 7 a mais de 14 dias. Essa biodegradação ocorreu somente em culturas mistas, identificadas como espécies de *Pseudomonas*. Este trabalho foi pioneiro na realização de experimentos de biodegradação, comprovando a possibilidade de bactérias utilizarem MIB como

única fonte de carbono para seu crescimento. Embora o composto MIB não seja a única fonte de carbono presente na natureza ou encontrado em concentrações tão elevadas para suportar o crescimento bacteriano, o fato de ele ser metabolizado por microrganismos sugeriu um potencial de utilização das bactérias presentes no próprio ambiente na remediação dos problemas de gosto e odor na água.

A identificação e a capacidade de degradação de MIB e geosmina por bactérias aquáticas têm sido estudadas sob diferentes condições experimentais (Tabela 2).

Tabela 2: Microrganismos relacionados à biodegradação dos compostos MIB e geosmina.

Compostos	Microrganismos	Referências
MIB	<i>Candida</i> spp.	Sumitomo (1988)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Yagi <i>et al.</i> (1988)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Izaguirre <i>et al.</i> (1988), Egashira <i>et al.</i> (1992), Tanaka <i>et al.</i> (1996)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Egashira <i>et al.</i> (1992)
	<i>Flavobacterium multivorum</i>	
	<i>Flavobacterium</i> spp.	
	<i>Pseudomonas putida</i>	Oikawa <i>et al.</i> (1995)
	<i>Enterobacter</i> spp.	Tanaka <i>et al.</i> (1996)
	<i>Bacillus</i> spp	Ishida e Miyaji (1992), Lauderdale <i>et al.</i> (2004)
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	Eaton e Sandusky (2009)	
geosmina	<i>Bacillus cereus</i>	Silvey <i>et al.</i> (1970), Narayan e Nunez (1974)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Narayan e Nunez (1974), Yagi <i>et al.</i> (1988)
	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	Saadoun e El-Migdadi (1998)
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	
	<i>Rhodococcus moris</i>	
	<i>Chlorophenolicus cepa</i> N-1053	Hoefel <i>et al.</i> (2006 e 2009)
	Bactérias gram negativas (<i>Sphingopyxis</i> spp, <i>Sphingomonas</i> spp, pseudomonad group)	
	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	
	<i>Pseudomonas</i> sp. SBR3-tpnb	Eaton e Sandusky (2010)

Ishida e Miyaji (1992) relataram que um isolado identificado como *Bacillus* sp, obtido no Lago Kasumigaura (Japão), foi capaz de crescer em um meio contendo 0,1 mg/l de MIB, como única fonte de carbono. A capacidade de uma cepa denominada HI-5 utilizar outras fontes de carbono, que não MIB, foi demonstrada pela relação entre o aumento do número de microrganismos e o decréscimo do carbono orgânico dissolvido, obtidos de uma água de retrolavagem e do meio ágar-levedura. As bactérias que cresceram nestes meios começaram a degradar MIB após aproximadamente 8 horas da fase lag. A capacidade de biodegradação de MIB foi demonstrada em experimentos com biofilmes de reatores semeados com a cepa HI-5, onde as concentrações de 600 ng/l de MIB foram reduzidas para 60 ng/l.

Egashira *et al.* (1992) constataram a influência da temperatura no processo de filtração biológica de MIB, bem como o pH ótimo para a degradação entre 7,0 a 9,0, em temperatura constante de 20°C. A taxa de remoção de MIB foi fortemente dependente da concentração inicial deste composto sob as condições deste estudo. Esse efeito foi demonstrado utilizando-se concentrações que variaram de 0,5 a 20 µg/l, 25°C e pH inicial de 7,0. Entretanto, os autores alertaram sobre a necessidade de outras pesquisas sobre a remoção biológica utilizando uma faixa mais ampla de concentrações iniciais de MIB. Os resultados mostraram que a degradação deste composto foi uma reação de primeira ordem, onde o aumento da concentração inicial do composto favoreceu o potencial de degradação.

Izaguirre *et al.* (1988b) mostraram que a remoção de MIB, na concentração de 290 ng/l, levou 11 dias para ocorrer, enquanto os experimentos utilizando uma concentração bem mais elevada, 2,0 mg/l ocorreu praticamente com o dobro do tempo, 20 dias, corroborando com o resultado citado acima. O potencial de degradação das 34 bactérias isoladas dos filtros indicou que 11 bactérias tiveram capacidade de degradar MIB na faixa de 16,7 a 49,5%, usando uma concentração inicial de 20 µg/l, 25°C, pH 7,2 e tempo de reação de 24 horas. Baseado nos resultados de coloração de Gram e provas bioquímicas, as 11 bactérias foram classificadas em dois gêneros, *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, duas espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Flavobacterium multivorum*, e as demais não foram identificadas. A importância do processo de identificação dos microrganismos, que agem na degradação de MIB, foi demonstrada neste estudo, visto que as bactérias citadas anteriormente são aeróbicas explicando a diminuição do potencial de

degradação quando as condições de aeração foram reduzidas, confirmando os resultados encontrados por Lundgren *et al.* (1988).

Saito *et al.* (1999) estudaram o processo de degradação biológica de geosmina, utilizando inóculos coletados de um filtro biológico e de um lodo ativado de uma Estação de Tratamento de Esgoto. Os resultados mostraram, em contraste com estudos de biodegradação de MIB, que o composto geosmina foi extremamente difícil de ser degradado por processos microbiológicos. Em condições normais de cultura, onde a geosmina foi usada como única fonte de carbono, nenhum subproduto do composto foi detectado nas culturas usando a água do filtro biológico e o lodo ativado, mesmo após cinco meses de experimento. Entretanto, a adição de uma pequena quantidade de etanol, nas soluções das culturas citadas acima, acelerou drasticamente a biodegradação. Durante um período de 14 dias, metabólitos foram detectados nas duas culturas, mas com uma pequena diferença nos padrões da cromatografia gasosa de cada um. Isso provavelmente pode ser explicado pelo conceito de cometabolismo (Noma *et al.*, 1974 apud Saito *et al.*, 1999). Assim, dos quatro principais produtos da biodegradação de geosmina, detectados nas culturas do lodo ativado, os dois mais representativos foram: 1,4a-dimetil-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidronaftaleno e enona.

Desde a década de 1970, o Lago Kasumigaura, no Japão, é usado como manancial de abastecimento, apesar da sua eutrofização. Esse lago tem sofrido anualmente a ocorrência de episódios de odor de mofo. Esses eventos são causados pela proliferação da cianobactéria filamentosa *Phormidium tenue*, durante a primavera e outono, e pelo crescimento de actinomicetes do gênero *Streptomyces* no sedimento do lago no verão e outono (Sugiura *et al.*, 2003). Esse dado foi comprovado pelo isolamento da cianobactéria, onde em condições de cultura produziu somente o composto MIB, ficando evidente a necessidade de reduzir a presença da cianobactéria no lago. Na estação de tratamento de água de Kasumigaura, o uso combinado de microrganismos com o processo de tratamento convencional foi conduzido no ano de 1985. O resultado dessa combinação foi a remoção efetiva dos compostos causadores de odor. Entretanto, a função dos biofilmes associados à redução de odor ainda precisa ser entendida.

Lauderdale *et al.* (2004), estudaram o isolamento e a identificação de bactérias capazes de remover o gosto e o odor causados pelo composto MIB. Os resultados mostraram que os microrganismos isolados a partir da água do Lago

Manatee (Flórida – EUA) degradaram aerobicamente o composto MIB. Isso indica que os microrganismos presentes num determinado ambiente exercem uma importante função na ciclagem dos compostos causadores de gosto e odor durante episódios sazonais de florações de cianobactérias. Este trabalho mostrou que não existe diferença significativa nas porcentagens de degradação de MIB, quando se utiliza concentrações de mg/l e ng/l, chegando em torno de 66% no tratamento com 25 ng/l de MIB. Esta conclusão discorda do trabalho de Egashira *et al.* (1992), onde os potenciais de degradação de MIB aumentaram com concentrações iniciais mais elevadas. As bactérias isoladas neste estudo utilizaram MIB como substrato de crescimento, tanto em altas como em baixas concentrações, sendo também capazes de usar outras fontes de carbono para o crescimento e formação de esporos. Isto sugere a habilidade desta cultura ser isolada de fontes de água natural para remoção de MIB durante eventos sazonais de florações de cianobactérias, levando em consideração a sensibilidade da cultura em relação às concentrações deste composto. Estes autores determinaram que a taxa máxima de crescimento das bactérias ocorreu na concentração de 10 mg/l e a taxa máxima de consumo de oxigênio na concentração de 5 mg/l, sugerindo um efeito tóxico do MIB no crescimento das bactérias. Assim, a sensibilidade das culturas precisa ser determinada previamente para aperfeiçoar a aplicação de um biofilme na remoção desses compostos, durante as flutuações sazonais dos mesmos, observadas nos mananciais de abastecimento de água.

1.3.4.1 Isolamento e caracterização de bactérias capazes de degradar MIB e geosmina

Diversos trabalhos reportam a identificação de microrganismos capazes de degradar os compostos causadores de gosto e odor através do uso de águas naturais como fontes de inóculos para uma cultura líquida. Izaguirre *et al.* (1988a), relataram o uso de uma técnica comum para o isolamento de culturas bacterianas puras capazes de degradar MIB. Neste método, amostras de água ou sedimento foram coletadas de lagos contaminados pelos compostos causadores de gosto e odor e inoculadas em meio mineral contendo MIB. Assim, os isolados purificados foram identificados, bem como se comprovou o decréscimo na concentração do

composto, após um período de incubação que variou de três a 20 dias. Exemplos de algumas bactérias isoladas incluem *Pseudomonas aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. paucimobilis* e *P. mendocina*. Outras publicações também relatam o sucesso no processo de isolamento, seguindo metodologia semelhante, porém com identificação de outras espécies bacterianas como: *B. subtilis* e *Flavobacterium multivorum* (Ishida e Miyaji, 1992; Egashira *et al.* 1992).

Após o isolamento existe a possibilidade de caracterização através da morfologia celular e provas bioquímicas, aplicadas para vários grupos bacterianos a fim de determinar as propriedades metabólicas de cada espécie. Outra possibilidade de identificação destas bactérias é através da comparação de suas sequências gênicas. Neste sentido, o sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (16S rRNA) tem sido amplamente utilizado (Glöckner *et al.*, 2000, Blackwood *et al.*, 2004 e Lauderdale *et al.*, 2004) para estimar a porcentagem de divergência entre as sequências relacionadas, promovendo uma maior precisão quando comparado aos métodos baseados em análises fenotípicas (Chester e Cleary, 1980). Essas informações poderiam então ser utilizadas para construir árvores filogenéticas, comparando as culturas isoladas com espécies conhecidas.

A biodegradabilidade dos compostos MIB e geosmina demonstrada anteriormente possibilita a utilização de bactérias, encontradas em ambientais naturais, no processo de oxidação biológica como uma metodologia alternativa promissora na remoção de compostos causadores de gosto e odor em águas de abastecimento.

1.3.5 Processos de Filtração Biológica

A biorremediação é o uso de microrganismos para eliminar ou detoxificar produtos químicos não desejáveis, podendo ser empregada no tratamento de água para eliminar produtos químicos naturais ou antropogênicos (Characklis e Marshall, 1990). Uma das aplicações mais comuns da biorremediação no tratamento de água é a filtração biológica.

A biodegradabilidade dos metabólitos MIB e geosmina é um indicativo que existe um grande potencial para o uso de processos, com filtros biológicos, como uma opção viável no tratamento de remoção de gosto e odor (Ho *et al.*, 2007). Nos últimos anos, a utilização desses sistemas de filtro para remoção de vários

contaminantes tem se tornado interessante para as companhias de tratamento de água, devido à exigência de baixa tecnologia, pouca manutenção e infra-estrutura. Além disso, esse processo não necessita de adição de produtos químicos, os quais podem liberar subprodutos indesejáveis a água potável (Ho *et al.*, 2007). Um benefício adicional dos biofiltros é a significativa redução da formação de trihalometanos e demanda de cloro das águas tratadas (Graham, 2000). Entretanto, a necessidade de um período de aclimação dos microrganismos, no início do funcionamento do biofiltro, e a manutenção das bactérias que degradam MIB e geosmina dentro do filtro, nos períodos de ausência desses compostos, podem ser consideradas como desvantagens, no momento da escolha do método biológico de remoção de gosto e odor (Elhadi *et al.*, 2004).

As células microbianas frequentemente aderem firmemente em superfícies submersas em ambientes aquáticos. Essas células imobilizadas crescem, se multiplicam e produzem polímeros extracelulares que podem formar uma matriz de fibras entrelaçadas. Um biofilme é um conjunto dessas fibras (Characklis e Marshall, 1990). As tecnologias baseadas no conceito de biofilme são atualmente empregadas no tratamento de ar, água e esgoto. Reatores de leito empacotado, nos quais os biofilmes são acumulados sobre o substrato sólido ou no meio granular arranjado dentro de uma torre ou leito, são frequentemente usados no tratamento de água. Uma vez que o desenvolvimento do biofilme depende da área superficial do meio com capacidade adsortiva, uma alta relação superfície/volume (área superficial específica) melhora a eficiência do processo. É o que ocorre com partículas pequenas e/ou porosas, como, por exemplo, areia, que é convencionalmente utilizada em filtros percoladores. No entanto, estes filtros percoladores convencionais têm se apresentado pouco eficientes na remoção de MIB e geosmina em águas de abastecimento, sugerindo a necessidade de testar outros meios granulares alternativos (Ashitani *et al.*, 1988).

Nos estudos sobre filtração biológica de MIB e geosmina, um dos meios filtrantes mais testados foi o CAG (Ashitani *et al.*, 1988; Lundgren *et al.*, 1988; Sumitomo, 1998). Entretanto, o uso de meios porosos em tais experimentos interfere no conhecimento da capacidade de remoção dos filtros de CAGs, devido a sua habilidade de agir como um meio suporte para um biofilme, além de suas propriedades adsortivas.

A remoção dos compostos causadores de odor, na Planta de Purificação Kunizima (Osaka – Japão) mostrou que o processo de filtração em CAG, sem pré-cloração, removeu esses compostos por um período maior do que três anos. Entretanto, a utilização de pré-cloração provocou um declínio acentuado na capacidade de remoção desses filtros, confirmando a atividade microbiológica (Yagi *et al.*, 1988). No sentido de examinar a função das bactérias neste sistema, Yagi *et al.* (1988) estudaram o funcionamento de um filtro biológico ativo, para redução das concentrações de MIB e geosmina. Neste experimento, o meio filtrante utilizado foi o CAG inoculado com uma cultura de *B. subtilis*, confirmando a degradação biológica dos compostos no processo de filtração. Portanto, a presença das bactérias aumentou o tempo de carreira dos filtros pela remoção dos compostos presentes nos poros do carvão. Os meios filtrantes testados, juntamente com o inóculo da espécie *B. subtilis* IAM 12118, para verificar qual é mais efetivo na preparação de filtros biologicamente ativos, foram CA (casca de coco, 10x32 mesh), zeolita e areia. Dos três meios, o carvão foi o mais eficiente na redução dos compostos. Os demais não apresentaram capacidade adsortiva, nem desenvolvimento de biofilme. A falta de informações quantitativas com relação ao biofilme e aos nutrientes do afluente pode indicar falhas na metodologia demonstrada pela baixa eficiência dos meios filtrantes.

A combinação dos processos de adsorção e biodegradação minimizam a flutuação da qualidade da água tratada, porque as altas concentrações dos poluentes na água provocam um aumento na taxa de adsorção, mas quando a concentração diminui o processo de biodegradação começa a ser mais efetivo (Speitel e DiGiano, 1987). Os processos de biodegradação aumentam a capacidade adsortiva do CA e, como consequência, a remoção de compostos não-biodegradáveis da água é favorecida (Speitel *et al.*, 1989). Durante as primeiras semanas de operação de um filtro de CAG, prevalecem os processos de adsorção. Entretanto, o CAG é considerado um bom material para o desenvolvimento de microrganismos aderidos. Estes estão presentes na superfície externa e dentro dos macroporos das partículas de CAG (Seredynska-Sobecka *et al.*, 2006). Nos primeiros estágios da colonização, uma boa parte da produção microbiana dentro do filtro é removida com a água efluente. Uma explicação para isso, é que muitos microrganismos presentes no CAG durante este período não são adaptados para permanecerem aderidos (Servais *et al.*, 1994).

Terauchi *et al.* (1995) descreveram os resultados de remoção de MIB e geosmina em uma planta piloto e o efeito do uso de filtros biológicos nos processos de tratamento subsequentes. A planta era composta de uma coluna de PVC com 40 cm de diâmetro interno, 4 m de altura e foi preenchida com meio cerâmico poroso. O afluente, água do Lago Biwa (Japão), foi bombeado em fluxo descendente por gravidade. Fora dos períodos críticos de gosto e odor, o composto MIB foi adicionado artificialmente ao afluente em uma concentração máxima de 1407 ng/l. Os resultados mostraram a ocorrência de grandes variações nas concentrações totais e solúveis de MIB na água. Entretanto, cerca de 60 a 80% do composto foi efetivamente removido pelo processo de filtração biológica. Nos experimentos com adição de MIB, a remoção foi de 70 a 80%. Entretanto, com elevadas concentrações desse composto no afluente, a água tratada apresentou quantidades detectáveis pelos consumidores. Para resolver esse problema foi aplicado CAP, como método complementar de tratamento. Assim, uma série de experimentos foi realizada para determinar a dose de CAP necessária para mitigar o problema. Os resultados mostraram que a dose necessária de CAP foi reduzida cerca de 1/3, quando o processo de filtração biológica foi utilizado previamente à aplicação de CAP. Este estudo confirmou o bom rendimento do uso de filtros biológicos na remoção de MIB e demonstrou que a associação de métodos de tratamento é fundamental para garantir uma água de qualidade para a população.

Elhadi *et al.* (2004) realizaram experimentos em escala de bancada usando colunas de filtração em paralelo, contendo como meios filtrantes o CAG virgem, CAG saturado e areia. A água utilizada consistiu de água tratada, sem cloro, com adição de MIB e geosmina e um conjunto de compostos que formam uma MO facilmente biodegradável, simulando os produtos gerados no processo de ozonização. Os resultados mostraram que o CAG virgem foi capaz de remover a geosmina em uma porcentagem de 76 a 100%, e MIB em uma faixa de 46 a 100%. O CAG saturado inicialmente removeu menos geosmina e MIB, mas a remoção aumentou ao longo do tempo. Assim, os autores afirmaram que o processo de ozonização seguido de filtração biológica tem potencial para remover MIB e geosmina, embora libere substâncias indesejáveis. A biofiltração subsequente à ozonização pode remover MIB e geosmina residuais, além de outros compostos biodegradáveis.

O estudo de Ho *et al.* (2006) forneceu dados com relação aos processos de biodegradação de MIB, geosmina e microcistina-L-R utilizando filtros de areia

biológicos. Assim, foi possível identificar as bactérias, e possíveis genes, responsáveis pela degradação dos metabólitos no filtro e desenvolver técnicas moleculares para identificar os genes responsáveis pela degradação de cada metabólito. Isto porque, atualmente, não existem métodos para determinar se um filtro biológico contém uma bactéria capaz de degradar os compostos MIB e geosmina. Com isso, as técnicas moleculares poderiam ser usadas para monitorar a capacidade de degradação de cada metabólito através dos filtros biológicos. Este conhecimento tem enorme valor para as companhias de tratamento de água, pois a ocorrência de episódios de gosto e odor são frequentes em águas de abastecimento. Os resultados do trabalho mostraram que os compostos MIB, geosmina e microcistina-L-R foram degradados em filtros de areia biológicos. A microcistina-L-R foi o metabólito mais facilmente degradado por processos biológicos, com uma fase lag máxima de cinco dias antes da remoção efetiva. Em contraste, os compostos MIB e geosmina foram difíceis de degradar, com um período que excedeu 75 dias antes de uma remoção de cerca de 95%. A detecção do gene *mlrA*, no biofilme de uma das colunas, indica que a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser usada para avaliar rapidamente a presença de microrganismos com capacidade de degradarem microcistina. O gênero *Sphingomonas* sp. foi associado ao potencial de degradação de geosmina através da técnica de eletroforese em gel por gradiente de desnaturação (DGGE). Esta mesma análise revelou uma comunidade bacteriana complexa durante a degradação de MIB, sugerindo que mais de um microrganismo foi responsável pela degradação deste composto. Neste sentido, uma vez concluída a identificação das bactérias, é possível identificar os genes envolvidos nos processos de degradação, através de técnicas moleculares como a PCR.

Ho *et al.* (2007) mostraram que os compostos MIB e geosmina foram facilmente removidos através de filtros de areia em escala de bancada, predominando a biodegradação. Este processo foi influenciado pela concentração inicial do biofilme, mas não pela concentração inicial dos compostos causadores de gosto e odor. Além disso, as taxas de biodegradação aumentaram quando o biofilme foi re-exposto aos compostos MIB e geosmina. Este estudo possibilitou a identificação de quatro bactérias, *Pseudomonas* sp., *Alphaproteobacterium*, *Sphingomonas* sp. e Acidobacteriaceae como os microrganismos envolvidos no processo de biodegradação em filtros de areia e em bioreatores.

Os trabalhos que tratam dos processos de biofiltração incluem experimentos de bancada e em escala piloto, usando principalmente CAG e areia como meio suporte para o biofilme. A combinação de métodos de tratamento, como filtros biológicos, ozonização e aplicação de CAP, apresentaram bons resultados de remoção de MIB e geosmina. Estudos mais recentes (Hoefel *et al.*, 2009; McDowall *et al.*, 2009) têm mostrado a importância de identificar as bactérias e os genes envolvidos no processo de biodegradação, como uma ferramenta adicional a ser usada pelas companhias de tratamento de água que utilizam os processos de filtração biológica.

Uma vez que grande parte das atuais tecnologias aplicadas no tratamento de água apresenta deficiências, existe a necessidade de desenvolver novas alternativas de tratamento, que sejam viáveis em termos financeiros e operacionais. Dentro deste contexto, e em função dos antecedentes bibliográficos pesquisados, é possível prever um grande potencial dos processos de oxidação biológica em relação à remediação de águas contaminadas com metabólitos produzidos por algas e cianobactérias. Por isso, surge a necessidade de estudos sistemáticos, que permitam avaliar o real potencial dos processos, quando direcionados a substratos específicos e representativos dos resíduos em questão.

1.4 Delineamento Experimental

Este item descreve a área de coleta da água para obtenção dos inóculos de bactérias, a metodologia utilizada nos experimentos de isolamento, caracterização e identificação dos microrganismos capazes de degradar MIB e geosmina, bem como do potencial de degradação biológico e da remoção dos compostos causadores de gosto e odor na água através de CAG.

1.4.1 Descrição da área de obtenção dos inóculos de bactérias

O Lago Guaíba, que faz parte da Região Hidrográfica do Guaíba, possui uma área de cerca de 470 km² de superfície e uma profundidade média de 2 metros (29°55' a 30°37' de latitude Sul e 50°56' a 51°46' de longitude Oeste). Estende-se desde o Delta do Jacuí, ao norte, até a ponta de Itapuã, no início da laguna dos Patos, ao sul (Menegat *et al.*, 1998) (Figura 2).

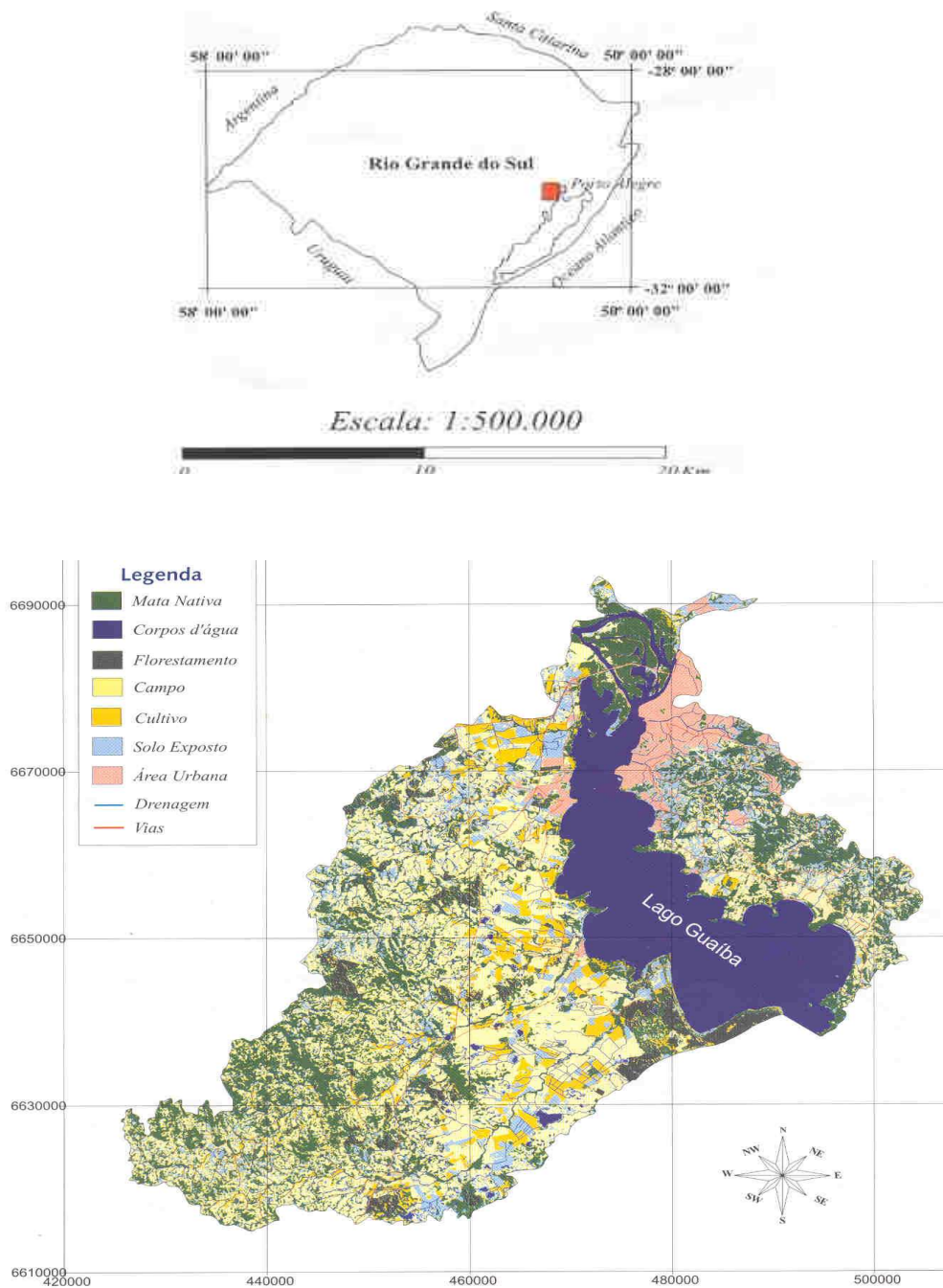


Figura 2: Localização da Região Hidrográfica do Lago Guaíba (Fonte: UFRGS/Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba).

Nos últimos 50 anos, a qualidade da água do Lago Guaíba vem se deteriorando devido ao despejo de grandes quantidades de efluentes industriais e agrícolas, além de esgotos domésticos “*in natura*” ou parcialmente tratados e poluentes encontrados na drenagem pluvial. Além de receber efluentes da cidade de Porto Alegre, o Lago Guaíba é receptor de despejos de uma bacia hidrográfica onde

residem cerca de 70% da população do Rio Grande do Sul e são gerados dois terços das riquezas do estado. Essas alterações começaram a ser mais evidentes a partir de 1998, quando o Lago Guaíba passou a apresentar florações de cianobactérias (DMAE, 2003). Desde lá, o Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) vem buscando alternativas tecnológicas para manter a água com boa qualidade, conforme estabelece a portaria 518 do Ministério da Saúde. Para enfrentar as dificuldades, o DMAE passou a utilizar CA e dióxido de cloro no processo de tratamento de água com o objetivo de combater os efeitos provocados pelas cianobactérias (DMAE, 2007).

O ano de 2004 foi marcado por um expressivo evento de floração de cianobactérias no Lago Guaíba, favorecido por um intenso período de seca, que afetou três estações de tratamento de água da cidade de Porto Alegre. De Janeiro a meados de Abril foram intensificadas as análises do fitoplâncton, a determinação das toxinas e avaliadas as concentrações dos compostos causadores de gosto e odor, devido às alterações observadas nestes parâmetros na água tratada (Bendati *et al.*, 2005). Nesse evento, as concentrações de MIB e geosmina na água bruta atingiram valores elevados, 1985 e 17 ng/l, respectivamente, e na água após passar pelo tratamento com CAP, 838 e 5,5 ng/l (Bendati *et al.*, 2005). Mesmo com o intenso esclarecimento à população, com relação à manutenção da qualidade de potabilidade, foi registrada a redução do consumo de água da torneira, intensificando assim o uso de água mineral ou de outras fontes, aumentando o risco à saúde por contaminação microbológica (Bendati *et al.*, 2005). Esses resultados indicam que a atual metodologia de tratamento não foi eficiente para reduzir as concentrações abaixo do LDO, causando reclamações por parte dos consumidores.

O problema de gosto e odor, causado pela presença das cianobactérias, levou o DMAE a investigar novas técnicas e sistemas de tratamento água. Assim, a opção pela utilização de CAP junto a uma estação de tratamento de água bruta exigiu a construção de uma unidade física de aplicação e um depósito de CA (DMAE, 2007). Desta forma, a água bruta chega em melhores condições para o tratamento e sem resíduos indesejáveis como ocorrem com outros produtos químicos inorgânicos que têm a mesma função do carvão. A utilização dessa tecnologia exigiu gastos de quase R\$ 2 milhões no verão de 2007, sem considerar os gastos com estrutura e equipamentos. Assumindo-se que a qualidade da água é um fator limitante para o desenvolvimento social e econômico do país, existem lacunas que precisam ser

preenchidas para que possamos garantir, de forma segura e confiável, a qualidade de água em nossos mananciais e nos sistemas de abastecimento público (FUNASA, 2003).

1.4.2 Isolamento e identificação das bactérias capazes de degradar MIB e geosmina

1.4.2.1 Coleta dos inóculos

Os microrganismos foram obtidos através de duas campanhas de coleta, sendo uma a partir da água do Lago Guaíba sem floração de cianobactérias e com baixa concentração de MIB e geosmina, denominada **Experimento I**, e outra durante um intenso evento de floração, onde foi registrada elevada concentração de MIB, chamada de **Experimento II**. Os frascos utilizados para a coleta de água foram previamente autoclavados e parcialmente fechados na extremidade com gaze, sendo que o volume total coletado em cada campanha foi de 6 l.

Simultaneamente à amostragem de água coletada para obtenção das bactérias foram medidas as variáveis físicas e químicas: temperatura da água e do ar, pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (Sonda multiparâmetro Quanta - Hidrolab), transparência da água (Disco de Secchi), turbidez (turbidímetro TD 200 Instrutherm), carbono total, carbono orgânico e carbono inorgânico (Startoc Benchtop).

A análise quantitativa das cianobactérias foi efetuada em microscópio invertido Opton e a densidade estimada segundo Utermöhl (1958).

1.4.2.2 Isolamento das bactérias

O isolamento das bactérias seguiu o procedimento adotado por Lauderdale *et al.* (2004), com modificações, para os Experimentos I e II.

- O aparato experimental, denominado de Sistemas 1, 2 e 3, utilizado para a formação do biofilme era composto de três colunas de vidro com 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro cada, acopladas a três reservatórios na parte superior, e outros três reservatórios na parte inferior. A cada um dos sistemas foi

conectada uma bomba peristáltica para manter a circulação da solução através da coluna e dos reservatórios, mantendo um sistema fechado (Figura 3).

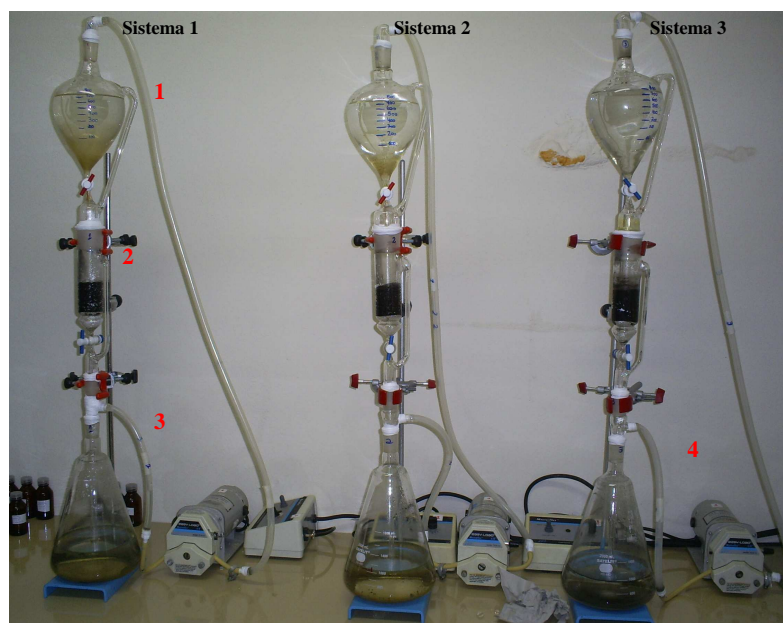


Figura 3: Aparato experimental para o isolamento das bactérias. Legenda: 1) reservatório superior para circulação da solução (MIB, geosmina e água do Lago Guaíba contendo inóculos de bactérias); 2) coluna com carvão antracitoso para formação do biofilme; 3) reservatório inferior; 4) bomba peristáltica.

Cada uma das colunas foi preenchida com carvão antracitoso granular, previamente esterilizado em forno de Pasteur a 160°C por 2 horas, que serviu de suporte para a formação do biofilme. Toda a vidraria do aparato experimental de cada Sistema foi também previamente esterilizada nas mesmas condições, enquanto que as mangueiras e conexões foram autoclavadas a 121°C por 1 hora. A montagem dos Experimentos I e II foi realizada em câmara de fluxo laminar para evitar contaminações externas.

- Os compostos MIB e geosmina foram adicionados à água do Lago Guaíba na concentração de 2 µg/l, em cada Sistema para os Experimentos I e II. Esta concentração foi escolhida de acordo com relatos da bibliografia.
- Os Sistemas 1 e 2 tiveram as mesmas condições de funcionamento e a mesma composição da solução contendo os inóculos, sendo considerados réplicas, enquanto no Sistema 3, chamado de controle, a água do Lago Guaíba foi

previamente autoclavada, para eliminar os microrganismos e não ocorrer crescimento de biofilme na coluna com carvão. Dessa forma pode-se afirmar que os microrganismos estavam presentes na água do Lago Guaíba.

- Após a formação do biofilme nos Experimentos I e II, o carvão de cada uma das colunas foi removido para posterior isolamento das bactérias.
- Após a desagregação do biofilme foram realizadas diluições seriadas das amostras em água peptonada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). As amostras foram semeadas, pela técnica de espalhamento em superfície com alça de Drigalsky, em placas contendo MM (8.1) mais 2 $\mu\text{g/l}$ de MIB e geosmina e Ágar Padrão para Contagem (PCA) (8.2). Após o tempo de incubação, as colônias (Unidades Formadoras de Colônias - UFC) foram contadas na diluição apropriada, isto é, placas com 30 a 300 UFC. Para os dois meios de cultura, cada diluição seriada e a solução sem diluição foram preparadas placas em duplicata, 16 por sistema, totalizando 32 placas.
- Para o Sistema 3 (controle) o mesmo procedimento foi realizado, porém não esperando o aparecimento de colônias.
- A contagem das UFC foi realizada somente utilizando-se as colônias crescidas nas duas placas que continham a diluição 10^{-3} , dos Sistemas 1 e 2 de ambos os Experimentos.

1.4.2.3 Seleção das bactérias

- A partir do crescimento das colônias em MM com 2 $\mu\text{g/l}$ de MIB e geosmina dos Sistemas 1 e 2, selecionou-se 60 colônias consideradas morfologicamente diferentes, dos Sistemas 1 e 2 do Experimento I e 95 colônias do Experimento II. Essas colônias foram esgotadas em placas de MM acrescidas de 10 $\mu\text{g/l}$ de MIB e geosmina.
- As culturas puras foram obtidas a partir de seis esgotamentos em placas de MM com 10 $\mu\text{g/l}$ de MIB e geosmina.

1.4.2.4 Identificação dos isolados bacterianos

▪ Coloração de Gram: para confirmar a pureza das amostras e classificar as bactérias nos dois grupos, Gram-positivas (Gram⁺) e Gram-negativas (Gram⁻), foram utilizadas as colônias obtidas nos Experimentos I e II, sempre em fase exponencial de desenvolvimento. Para a coloração das amostras foi realizado um esfregaço de cada isolado e fixado em uma lâmina histológica pelo calor: o esfregaço inicialmente foi corado com cristal violeta por 1 minuto, deixando as células com cor púrpura. Após, as células foram cobertas por uma solução de iodo por 1 minuto e posteriormente as lâminas foram lavadas com uma solução de etanol e acetona que descora seletivamente alguns tipos de células. A remoção do álcool/acetona foi realizada através da lavagem em água para posterior coloração das células com safranina (contracorante) por 30 segundos. As bactérias Gram⁺ adquiriram a coloração púrpura, enquanto os organismos Gram⁻ apresentaram coloração cor-de-rosa.

▪ Identificação Molecular: para a realização da técnica da PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a amplificação de fragmentos do 16S rRNA.

➤ **Extração de DNA cromossomal dos isolados bacterianos**: a metodologia de extração do DNA cromossomal das bactérias seguiu o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Assim, os isolados bacterianos foram inoculados em 20 ml de caldo BHI (8.3), incubados a 30°C com agitação de 140 rpm por 72 horas. Posteriormente, 2 ml de cada cultura foram centrifugados por 1 minuto a 13000 rpm em microtubo. O sobrenadante de cada microtubo foi retirado e o “pellet” lavado uma vez com NaCl (1M) e ressuspendido com TE 1X (8.4). Após esse processo foram adicionados SDS na concentração final de 0,6% (8.5), lisozima na concentração de 0,2 mg/ml (8.6) e RNase (0,3 mg/ml) nos microtubos, os quais foram incubados a 37°C por 1 hora em banho de água. Após esse período adicionou-se Proteinase K com concentração final de 0,6 mg/ml (8.7) e a solução foi novamente incubada a 37°C por 1 hora. Após as incubações, 1 volume de fenol foi adicionado a solução, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, repetindo-se a extração com fenol. Novamente retirou-se o sobrenadante para outro microtubo, onde foi realizada uma extração

com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (8.8), homogeneizando e centrifugando por 10 minutos a 13000 rpm. A seguir duas extrações com clorofórmio/álcool isoamílico (8.9) foram realizadas. O DNA foi precipitado adicionando-se 0,7 volumes de isopropanol ao sobrenadante e incubado a -20°C por 16 horas. Após esse período a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 13000 rpm. Assim, o isopropanol foi desprezado e o DNA deixado secar a temperatura ambiente. Após foi ressuspendido em 50 µl de TE (8.10).

➤ **Quantificação do DNA total dos isolados bacterianos:** A quantificação do DNA total dos isolados bacterianos foi realizada por comparação da intensidade de banda em gel de agarose 0,8% (8.11) contendo brometo de etídeo (8.12). Sobre o gel foi adicionado 2 µl do DNA lambda (Invitrogen) nas concentrações de 251, 125,5, 62,75 e 31,37 µg/ml e 10 µl do DNA total extraído de cada isolado. O gel foi submetido a 75 volts (Eletroforesis Power Supply EPS301-Amersham Pharmacia Biotech) em tampão TAE 1X (8.13), por cerca de 40 minutos. Após esse procedimento, o gel foi colocado no transluminador sob luz UV e a intensidade de banda do DNA extraído foi comparada com as concentrações previamente conhecidas do DNA lambda.

➤ **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):** foram empregados *primers* universais 8F e 518R (Tabela 3), para a amplificação de fragmentos de DNA da região 16S do rRNA dos isolados bacterianos.

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), posição, alvo, sequência e referências bibliográficas.

Primer^a	Posição (bases)^b	Alvo	Sequência^c	Referências^d
8F	8-27	Universal	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	[1], [2], [3], [4]
518R	518-534	Universal, Região V3	ATT ACC GCG GCT GCT GG	[5], [6], [7], [8]

^a F, *Primer forward*; R, *Primer reverse*.

^b numeração da posição baseada no rDNA 16S de *Escherichia coli*.

^c região de anelamento; sequências representadas da região 5' – 3'.

^d [1] Burr *et al.* (2006), [2] Richardson *et al.* (2002), [3] González *et al.* (2000), [4], Liu *et al.* (1997), [5] Muyzer *et al.* (1993), [6] Hoefel *et al.* (2005), [7] Hoefel *et al.* (2006), [8] Ho *et al.* (2007).

A amplificação dos fragmentos 16S rDNA dos isolados foi realizada em um termociclador (Mastercycler personal Eppendorf) em um volume final de 30 µl. Em cada reação foi utilizado 3,0 µl de tampão (10X), 1,1 µl de MgCl₂ (50mM), 0,6 µl de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs - 10mM) (8.14), 0,2 µl de *Taq* polimerase Invitrogen (5U/ µl), 1,0 µl do oligonucleotídeo iniciador 8F (1 µM), 1,0 µl do oligonucleotídeo iniciador 518R (1 µM), 21,1 µl de água miliQ e 2,0 µl de DNA (30ng).

As condições de amplificação foram: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 2 minutos de extensão a 72 °C. Por último, seis minutos de extensão final a 72 °C.

➤ **Purificação dos produtos da PCR:** os produtos da PCR de cada uma das amostras dos isolados bacterianos foram purificados através do método de sílica, utilizando o Kit NewGene Preamp, realizado pelo Laboratório de Sequenciamento ULBRA/Simbios.

➤ **Sequenciamento:** o sequenciamento das amostras foi realizado pelo Laboratório de Sequenciamento – ULBRA/Simbios utilizando o Sequenciador Automático *ABI 3130XL Genetic Analyzer* de 16 capilares (50 cm cada) e polímero POP 7 (Applied Biosystems).

1.4.3 Degradação biológica dos compostos MIB e geosmina

Este experimento foi realizado para verificar a capacidade individual das bactérias degradarem MIB e geosmina na ausência de um substrato sólido. Para este ensaio foram utilizados erlenmeyers de 125 ml contendo 30 ml de MM, 3 ml de uma cultura que será o pré-inóculo, concentração de 1 µg/l de MIB e geosmina, agitação de 140 rpm a 30 °C. O pré-inóculo de cada bactéria foi obtido com 30 ml de MM, 10 µg/l de MIB e geosmina, agitação de 140 rpm e incubação de 72 horas. Após esse período de crescimento, a cultura foi centrifugada, lavada e ressuspendida em MM com 1 µg/l de MIB e geosmina.

A biodegradação foi avaliada em duplicata ao longo de dois tempos de contato: 48 e 120 horas. Neste último, as coletas foram realizadas em tempos específicos a cada 24 horas, totalizando cinco análises. A massa celular bacteriana foi determinada pela medida do peso seco, sendo que o tempo zero indicou a biomassa inicial. O experimento de 48 horas foi realizado com 13 bactérias, sendo

sete do Experimento I e seis do Experimento II, e o teste de 120 horas realizado com duas bactérias pertencentes ao Experimento II.

Para cada tempo foi incluído um controle químico, contendo somente uma solução de MM mais MIB e geosmina, para determinar a degradação natural dos compostos na ausência dos microrganismos.

1.4.4 Remoção dos compostos MIB e geosmina por CAG

Os carvões analisados eram compostos de diferentes materiais (madeira, coco e osso) e procedências (Tabela 4);, abrangendo matérias primas distintas, escolhidas de acordo com a experiência de utilização no Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (PROSAB 4).

Tabela 4: Tipo e procedência do CAG utilizado nos testes de remoção de MIB e geosmina.

Carvão ativado granular (CAG)	
Empresa	Tipo
Carbomafra	Casca de Coco (vegetal)
Carbomafra	Madeira (vegetal)
Bonechar	Osso (animal)

A capacidade adsorptiva foi analisada através das Isotermas de Freundlich e a caracterização dos carvões pelo número de iodo, área superficial BET e distribuição de tamanho de poros.

1.4.4.1 Caracterização dos carvões

- A análise do número de iodo foi realizada de acordo com a norma ABNT/MB 3410.
- A área superficial BET e a distribuição de tamanho de poros foram determinadas no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina. Segundo Teixeira *et al.* (2001) a adsorção de gases apresenta-se como uma técnica utilizada para caracterizar os principais parâmetros de porosidade de um sólido, que são a área superficial e a distribuição de tamanho de poros. A adsorção de nitrogênio permite a construção de isotermas de adsorção e desorção gasosa das quais se

podem extrair informações como a área superficial, volume dos poros e distribuição do tamanho dos poros.

1.4.4.2 Determinação do tempo de equilíbrio de adsorção

O tempo necessário para alcançar o equilíbrio da adsorção para cada carvão foi determinado antes da realização das Isotermas de Freundlich, sendo os tempos resultantes utilizados como tempo de contato nas isotermas. Para isso, utilizou-se uma dose de 15 mg/ de cada carvão juntamente com a concentração 1200 ng/l de MIB e geosmina em 500 ml de água destilada, sendo as amostras, em duplicata, retiradas nos intervalos de tempo: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, e 24 horas.

1.4.4.3 Determinação das Isotermas de Freundlich

As capacidades adsorptivas dos carvões foram determinadas quando estes foram expostos a soluções de MIB e geosmina através da análise das Isotermas de Freundlich. O experimento foi realizado em duplicata através da adição de dosagens crescentes de CAG (5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/l) em água destilada, contendo MIB e geosmina (1200 ng/l), seguindo a norma ASTM/D3860-98 à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de 160 rpm, com tempo de contato determinado pelo tempo de equilíbrio de cada carvão.

1.5 Análise dos Compostos MIB e geosmina

As soluções estoque de MIB e geosmina foram obtidas a partir de padrões (Wako Chemical) na concentração de 100 mg/l. O padrão interno *cis*-decahidronaftol foi utilizado para a quantificação das amostras.

A determinação das concentrações residuais de MIB e geosmina, nos experimentos de tempo de equilíbrio, Isotermas de Freundlich e potencial de biodegradação das bactérias foi realizada por cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massa (GCMS - GC 3800 Varian Saturn 2000) utilizando alíquotas de 30 ml. O método utilizado foi o de microextração em fase sólida (SPME) para extração dos compostos odoríferos das amostras de água e subsequente análise no GCMS (Yu-Hsiang *et al.*, 2005). Este método baseia-se na adsorção de MIB e geosmina por uma fibra de sílica modificada quimicamente, com posterior desorção térmica dos compostos no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa

(Lanças, 2004). As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar, livre de matéria orgânica e estocadas por um período máximo de três dias.

A análise dos compostos MIB e geosmina seguiu determinadas condições de extração dos compostos (Tabela 5), análise cromatográfica (Tabela 6) e análise por espectrometria de massas (Tabela 7).

Tabela 5: Condições de extração dos compostos MIB e geosmina através do método de microextração em fase sólida.

SPME – Microextração em Fase Sólida	
Composição da fibra	50/30 µm DVB/carboxen/PDMS (*)
Massa de NaCl	3,5 g
Volume dos vials	20 ml
Alíquota de água	15 ml
Temperatura de extração	60 °C
Tempo de exposição da fibra	30 min.
Temperatura de dessorção	250 °C
Tempo de dessorção	3 min.

(*) DVB: divinilbenzeno; PDMS: polidimetilsiloxano

Tabela 6: Condições de análise cromatográfica dos compostos MIB e geosmina no Cromatógrafo a gás Varian 3800.

Cromatógrafo	
Modo de injeção	<i>splitless</i>
Temperatura do injetor	250 °C
Coluna capilar	Chrompack cp-sil 8 cb-ms Dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm isoterma de 60 °C durante 3 min.
Programação do forno	taxa aquecimento 5 °C/min. até 150 °C taxa aquecimento 15 °C/min. até 250 °C isoterma de 250 °C durante 3 min.
Fluxo de gás He	Constante (1ml/min.)

Tabela 7: Condições de análise por espectrometria de massas dos compostos MIB e geosmina.

Espectrômetro de Massas Varian Saturn 2000	
Modo de ionização	EI (impacto eletrônico) 70 eV
Analizador de massas	<i>ion trap</i>
Temperatura <i>manifold</i>	50 °C
Temperatura da linha de transferência	280 °C
Temperatura do <i>trap</i>	200 °C

1.6 Apresentação dos Resultados

Os resultados dos experimentos de remoção de MIB e geosmina por CAG, onde estão inseridas a caracterização dos carvões, a determinação do tempo de equilíbrio de adsorção e as Isotermas de Freundlich foram compilados e constam no Capítulo II, intitulado “*Avaliação da capacidade adsortiva de diferentes carvões ativados granulares na remoção de 2-metilisoborneol e geosmina*”. Este artigo foi submetido à Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.

Os dados resultantes do processo de isolamento, seleção, identificação e degradação dos compostos MIB e geosmina por bactérias foram agrupados nos Capítulos III e IV. O capítulo III intitulado “*Biodegradação dos compostos causadores de gosto e odor (2-metilisoborneol e geosmina) em manancial de abastecimento de água no Rio Grande do Sul, Brasil*” é um trabalho completo apresentado no XXXI Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria Y Ambiental – AIDIS, realizado em Santiago, Chile, 2008. O capítulo IV intitulado “*Removal of 2-methylisoborneol and geosmin from water by bacteria: isolation, identification and biodegradation potential*” está escrito de acordo com as normas da revista Biodegradation, a qual o artigo será posteriormente submetido.

Capítulo II

**Avaliação da capacidade adsortiva de diferentes
carvões ativados granulares na remoção de 2-
metilisoborneol e geosmina**



Artigo submetido à Revista Engenharia Sanitária e Ambiental
(maio de 2010)

Avaliação da capacidade adsortiva de diferentes carvões ativados granulares na remoção de 2-metilisoborneol e geosmina

Evaluation of the adsorptive capacity of different granular activated carbons on removal of 2-methylisoborneol and geosmin

Viviane Berwanger Juliano

Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Endereço para correspondência: Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental (IPH/UFRGS) – Avenida Bento Gonçalves, 9500 CEP 91501-970, Caixa Postal 15029 - Porto Alegre - RS – Brasil – Tel. (51) 33086564, (51) 99057460 – Email: vivijuliano@hotmail.com

Luiz Fernando Cybis

Doutor em Engenharia Sanitária e Ambiental pela University of Leeds, Inglaterra.
Professor, Orientador, Pesquisador e Consultor do IPH da UFRGS.

Resumo

A presença dos metabólitos MIB e geosmina em mananciais de abastecimento público é a principal causa de gosto e odor de terra e mofo na água. A difícil remoção desses compostos exige mudanças nos processos de tratamento convencionais. O objetivo deste estudo foi avaliar a remoção de MIB e geosmina pela adsorção em três carvões ativados granulares, através das isotermas de Freundlich. Os resultados mostraram que o carvão de madeira reduziu a concentração de MIB abaixo do limite de detecção olfativa (10 ng.l^{-1}), apresentou a maior porcentagem de microporos totais e o maior valor da constante experimental K . Relativamente à geosmina, o carvão de casca de coco apresentou a mesma eficiência de remoção, com maior número de iodo, área superficial BET e constante K . Essa caracterização é um importante processo na escolha do carvão mais adequado para aplicação no tratamento de água.

Palavras-chave: 2-metilisoborneol, geosmina, carvão ativado granular e adsorção.

Abstract

The presence of MIB and geosmin metabolites in water public supply sources is the main cause of earthy-musty taste and odor in water. The difficulty in getting these compounds removed requires changes in the conventional treatment processes. The aim of this study was to evaluate the adsorption capacity for MIB and geosmin of three granular activated carbons through the Freundlich Isotherms. The results showed that wood carbon reduced MIB concentration below the odor threshold concentration (10ng.l^{-1}), and presented both the highest percentage of total micropores and the highest value of the experimental constant K . Regarding geosmin, only the coconut shell carbon had the same removal efficiency, with greater iodine number, BET surface area and constant K . This characterization is an important process in choosing the most appropriate carbon for application in the water treatment.

Keywords: 2-methylisoborneol, geosmin, granular activated carbon, adsorption.

Introdução

A ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais pode acarretar a formação de densa camada na água e, no caso de algumas cianobactérias, produzir metabólitos como 2-metilisoborneol (MIB) e trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol (geosmina) (CYBIS *et al.*, 2006). A presença de MIB e geosmina em mananciais de abastecimento tem exigido mudanças significativas nos processos de tratamento (COOK *et al.*, 2001), uma vez que são detectados pelos consumidores em concentrações baixas que variam de 5 a 10 ng.L^{-1} , deixando a água com cheiro e gosto de terra e mofo (HO *et al.*, 2007). Segundo Joe *et al.* (2007), estes compostos causam alterações na qualidade da água, porém não são perigosos para a saúde humana, causando somente desconforto estético. Entretanto, o estudo realizado por Huang *et al.* (2007) demonstraram que os extratos liberados por culturas das cianobactérias, *Anabaena*, *Microcystis* e *Oscillatoria*, contendo MIB e geosmina, entre outros compostos, têm atividade mutagênica, existindo a necessidade de identificar precisamente todos os compostos através de análises químicas e toxicológicas.

Os metabólitos MIB e geosmina, particularmente na forma dissolvida (extracelular), são recalcitrantes aos métodos convencionais de tratamento, sendo

de difícil remoção por coagulação-sedimentação e em filtros de areia rápidos (TANAKA *et al.*, 1996). Em alguns casos, os processos de tratamento convencionais podem provocar o rompimento das células das cianobactérias, resultando em uma liberação adicional dos metabólitos intracelulares (PIETSCH *et al.*, 2002). Assim, a remoção desses compostos, abaixo dos níveis de detecção, ainda é cara e ineficiente (UWINS *et al.*, 2007). A adsorção em carvão ativado (CA) vem sendo cada vez mais utilizada pelas companhias de abastecimento na remoção de compostos orgânicos e inorgânicos, dentre eles MIB e geosmina (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). O CA é um tipo de material carbonáceo, caracterizado por possuir área superficial interna elevada e porosidade altamente desenvolvida (COUTINHO *et al.*, 2000), de forma a possibilitar a adsorção de moléculas tanto em fase líquida como gasosa. O uso de CA no tratamento de água pode ser feito através do emprego de carvão ativado em pó (CAP) ou carvão ativado granular (CAG), dependendo da Estação de Tratamento de Água (ETA) e das condições da água bruta.

A adsorção por CAG no tratamento de água ocorre sob a forma de meios filtrantes em tanques ou filtros, onde a água permeia. Os compostos químicos presentes na água ocupam os sítios de adsorção dos poros do CAG, até que o carvão fique saturado e não tenha mais capacidade de reter as substâncias. Por isso, o CAG precisa ser retirado do filtro, reativado ou substituído por um carvão novo. O CAG pode ser utilizado como etapa de filtração/adsorção em que a filtração ocorre combinada à adsorção ou, mais comumente, como pós-adsorção, sendo o filtro de CAG colocado depois da filtração rápida, fazendo com que a água já filtrada passe pelo CAG somente para remover compostos orgânicos dissolvidos (BRANDÃO; SILVA, 2006).

De acordo com Donati *et al.* (1994) e Di Bernardo e Dantas (2005), a capacidade adsortiva de um CA é melhor avaliada através dos parâmetros: número de iodo, índice de azul de metileno, distribuição de tamanhos e área superficial dos poros. Entretanto, é preciso tomar cuidado, pois estes parâmetros avaliados isoladamente são muito específicos e não devem ser usados como indicadores gerais da eficiência dos CAs. A eficiência de adsorção do CA comercial para aplicação em ETAs pode ser avaliada através de ensaios que determinem sua isoterma de adsorção, que são representações gráficas que mostram a relação entre

a quantidade adsorvida por unidade de peso do adsorvente, no caso, o CAG (NG *et al.*, 2002).

As isotermas podem ser manipuladas na forma de equações matemáticas, representativas do modelo de adsorção de Freundlich, já utilizadas em outros estudos (CHEN *et al.*, 1997; COOK *et al.*, 2001; NG *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2005; BRASIL; BRANDÃO, 2005; KURODA *et al.*, 2005). A equação de Freundlich é empírica e muito utilizada visto que descreve com precisão os dados de ensaios de adsorção (DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

Dentro da problemática relacionada à presença de compostos causadores de gosto e odor na água, o objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade adsortiva de três tipos de CAGs na remoção de MIB e geosmina através das isotermas de Freundlich e a caracterização de cada um deles por meio dos parâmetros: número de iodo, área superficial BET e distribuição do volume de poros.

Metodologia

Com o objetivo de determinar qual o CAG possui a melhor capacidade adsortiva foi necessário trabalhar com carvões de diferentes materiais. Para isso, foram utilizados carvões de madeira, casca de coco e osso, abrangendo duas matérias primas distintas (vegetal e animal). Em todos os experimentos foram utilizados os carvões do mesmo lote, visto que carvões de lotes diferentes apresentaram resultados distintos para análise do número de iodo. As soluções estoque de MIB e geosmina foram obtidas a partir de padrões (Wako Chemical) na concentração de 100 mg.l^{-1} . O padrão interno *cis*-decahidronaftol foi utilizado para a quantificação das amostras.

Os carvões granulares foram pulverizados de modo que 95% passassem na peneira de 325 mesh, para a realização das isotermas, tempo de equilíbrio de adsorção e determinação do número de iodo. O procedimento seguiu a norma MB 3412 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS, 1991a), a fim de se obter o tamanho do grão das amostras de carvão granular, pois quanto menor for o tamanho do grão, maior será sua área superficial e com isso maior disponibilidade de locais de adsorção. Para a pulverização dos carvões foram utilizados os moinhos de Disco Orbital TE-360 e de bolas, sendo que este procedimento não altera as características adsortivas (CHEN *et al.*, 1997).

A caracterização dos carvões foi realizada através de ensaios de número de iodo, distribuição e volume de poros e a capacidade adsortiva avaliada através das Isotermas de Freundlich. O tempo necessário para alcançar o equilíbrio de adsorção para cada carvão foi previamente determinado, sendo estes resultados utilizados como tempo de contato nos experimentos de adsorção, isto é, Isotermas de Freundlich.

Caracterização dos carvões

A análise do número de iodo foi realizada de acordo com a norma MB 3410 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS, 1991b) que consiste na obtenção da quantidade de iodo removida por meio da adsorção no carvão granular, sendo utilizada como indicador da capacidade adsortiva. Essa quantidade foi obtida a partir da medida do residual de iodo após um tempo de contato, sendo determinado por meio de titulação com uma solução de tiosulfato de sódio e utilização de uma solução indicadora de amido.

A distribuição do tamanho e volume de poros e a área superficial de cada carvão foram determinadas através da Isoterma de Brunauer, Emmett e Teller (BET) (Brunauer *et al.*, 1938), técnica de adsorção de gás nitrogênio a temperatura de 77 K. Segundo Donati *et al.* (1994), o material usado na produção do carvão e a forma de ativação produzem carvões com estrutura interna e distribuição de tamanho de poros diferentes, determinando propriedades adsortivas distintas. O conhecimento da área superficial e a distribuição do volume dos poros são importantes para avaliar a eficiência do CA, visto que a máxima adsorção é proporcional ao tamanho da área superficial dentro dos poros que estão acessíveis para ocorrer este processo (Kuroda *et al.*, 2005).

Tempo de equilíbrio de adsorção

Para determinar o tempo de contato de adsorção para os três carvões foi aplicada uma dose de 15 mg.l^{-1} de cada carvão juntamente com a concentração 1200 ng.l^{-1} de MIB e geosmina em 500 mL de água destilada, sendo as amostras, em duplicata, retiradas nos intervalos de tempo: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, e 24 horas. Após estes períodos as mesmas foram filtradas com bomba de vácuo, em filtro de

fibra de vidro GF/F (0,45 μm), para remoção do carvão. Neste experimento foram incluídas amostras controle, contendo somente MIB e geosmina, para os tempos de contato já mencionados acima, para calcular as perdas ao longo de cada tempo analisado.

Isotermas de Freundlich

Neste estudo, as capacidades adsorptivas dos carvões foram determinadas quando estes foram expostos a soluções puras de MIB e geosmina através da determinação das Isotermas Freundlich. A isoterma é representada graficamente pela relação entre a quantidade de adsorvato (MIB/geosmina) pela unidade de peso de adsorvente (CAG), à temperatura constante, e a quantidade de adsorvato remanescente em solução no equilíbrio (SNOEYINK, 1990).

O modelo da Isoterma de Freundlich foi representado pela Equação 1 (Freundlich, 1928):

$$q_e = K C_e^{1/n} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

q_e = razão entre a quantidade de adsorvato e a quantidade de adsorvente (M.M^{-1});

C_e = concentração do adsorvato remanescente em solução, no equilíbrio (M.l^{-3});

K e n = coeficientes determinados empiricamente, isto é, constantes experimentais determinadas para um dado sistema adsorvato - adsorvente.

As constantes K e n podem ser determinadas quando os dados da equação são plotados como X-Y, onde $Y = \log q_e$ e $X = \log C_e$, a inclinação da curva é $1/n$ e a interceptação do eixo Y é $\log K$.

O ensaio foi realizado em duplicata e consistiu em adicionar dosagens crescentes de CAG, previamente pulverizados, em 500 mL de água destilada contendo MIB e geosmina. O experimento seguiu a norma D3860-98 (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2000) à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, com tempo de contato determinado pelo tempo de equilíbrio de cada carvão, sendo duas horas para os carvões de madeira e casca de coco e 12 horas para o de osso. A

utilização de água destilada, livre de competidores orgânicos pelos sítios de adsorção dos carvões, permitiu maior adsorção dos compostos MIB e geosmina pelos CAGs, e também garantiu a comparabilidade dos dados obtidos neste estudo. As doses de carvão empregadas foram de 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg.l⁻¹ e as concentrações de MIB e geosmina de 1200 ng.l⁻¹ cada, mantidas em agitação de 160 rpm, em equipamento de jarros (marca Alfa Tecnoquímica, modelo Alfakit AT700), a fim de manter o carvão em suspensão ao longo do tempo de contato. Após, as amostras foram filtradas, com auxílio de bomba de vácuo, em filtro de fibra de vidro GF/F (0,45 µm) para remoção do carvão, sendo a água filtrada utilizada para medir a concentração residual de MIB e geosmina. Amostras controle, contendo MIB e geosmina na concentração de 1200 ng.l⁻¹ cada e nenhuma dose de carvão, foram incluídas nos experimentos.

Optou-se por utilizar elevadas concentrações de MIB e geosmina, as quais ocorreram durante eventos de floração de cianobactérias no Lago Guaíba, importante manancial de abastecimento da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (BENDATI *et al.*, 2005). Os resultados foram apresentados de forma gráfica, segundo a Equação 2, mostrando a quantidade de MIB e geosmina adsorvida por unidade de massa de carvão.

$$q_e = (C_oV - C_eV)/M \quad \text{(Equação 2)}$$

onde:

q_e = quantidade de adsorvato por unidade de adsorvente (ng.mg⁻¹);

C_o = concentração inicial de MIB e geosmina (ng.l⁻¹);

C_e = concentração do adsorvato remanescente em solução (ng.l⁻¹);

M = massa de CAG (mg);

V = volume de amostra (l).

No gráfico, ambos em escala logarítmica, o eixo X representa a concentração residual de MIB e geosmina (C_e) e o eixo Y, q_e . O valor no eixo das ordenadas (q_e) que corresponde a concentração inicial de C_o , eixo das abcissas (C_e), pode ser obtido por extrapolação da isoterma. Este valor de q_e representa a quantidade de MIB e geosmina adsorvidos quando o carvão está em equilíbrio com a concentração

remanescente dos compostos em solução (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2000).

Análise dos compostos MIB e geosmina

As determinações das concentrações residuais de MIB e geosmina, nos experimentos de tempo de equilíbrio e nas Isotermas de Freundlich, foram realizadas por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massa (GCMS - GC 3800 Varian Saturn 2000) utilizando alíquotas de 30 ml. O método utilizado foi o de microextração em fase sólida (SPME) para extração dos compostos odoríferos das amostras de água e subsequente análise no GCMS (YU-HSIANG *et al.*, 2005).

Resultados e Discussão

Caracterização dos carvões

O número de iodo está relacionado com a adsorção de moléculas de pequeno peso molecular, sendo utilizado como indicador da capacidade adsortiva do CA e é um dos parâmetros estabelecidos pela norma EB-2133 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS, 1991c). Esta norma fixa as condições exigíveis para o fornecimento de CAP, utilizado na adsorção de impurezas no tratamento de água para abastecimento público.

A tabela 1 mostra que o carvão de casca de coco apresentou o maior número de iodo ($947 \text{ mg I}_2 \cdot \text{g}^{-1}$), seguido do carvão de madeira ($803 \text{ mg I}_2 \cdot \text{g}^{-1}$), e por fim o carvão de osso com menor valor ($127 \text{ mg I}_2 \cdot \text{g}^{-1}$). Os resultados da granulometria para os três tipos de CAG (tabela 1) indicaram que somente a amostra de carvão de osso não passou mais de 95 % na peneira de 325 mesh, mesmo utilizando um maior tempo de moagem em relação aos demais.

Tabela 1. Determinação granulométrica e número de iodo para os CAGs de madeira, casca de coco e osso.

CAG	Granulometria (#325) (%)	Nº Iodo ($\text{mgI}_2 \cdot \text{g}^{-1}$)
Madeira (vegetal)	98	803
Coco (vegetal)	98	947
Ossos (animal)	64	127

Os resultados obtidos pela análise BET indicaram a mesma sequência de valores do número de iodo, isto é, o carvão de casca de coco apresentou a maior área superficial, $1315 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, seguido do carvão de madeira e osso (tabela 2).

Tabela 2: Área superficial e distribuição do volume de poros para os CAGs de madeira, casca de coco e osso.

Carvão	Área Superficial BET ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volume ($\text{cm}^3 \cdot \text{mg}^{-1}$) - % de volume de poros				
		Microporos Primários	Microporos Secundários	Microporos Totais	Mesoporos	Macroporos
Madeira	716	1,129 – 80	0,079 – 6	1,209 - 86	0,178 - 12	1,412 - 2
Coco	1315	1,831 -77	0,114 – 5	1,945 - 82	0,391 - 16	2,386 - 2
Ossos	131	0,078 – 19	0,010 – 3	0,088 - 22	0,214 - 52	0,409 - 26

Com relação à distribuição de tamanho de microporos, a sequência se inverteu entre os carvões de origem vegetal, onde o carvão de madeira foi o que apresentou a maior porcentagem de microporos totais (86%), seguido dos carvões de casca de coco (82%) e osso (22%). Assim, os carvões de origem vegetal foram os que apresentaram os maiores valores de número de iodo, área superficial BET e microporos totais, bem como baixos valores de macroporos, quando comparados com o carvão de origem animal.

Tempo de equilíbrio de adsorção

A partir da porcentagem de remoção de MIB e geosmina e das perdas ao longo dos tempos de contato optou-se por usar como tempo de equilíbrio para os carvões de madeira e casca de coco duas horas, e para o carvão de osso 12 horas. Nesses tempos, a remoção de MIB e geosmina foi superior a 90% e as perdas foram mínimas (5%), não interferindo nos valores reais de remoção para os carvões de madeira e casca de coco. Na escolha do tempo de contato de 12 horas para o carvão de osso, a remoção de MIB e geosmina acima de 90% pode ser um valor superestimado, pois a perda ao longo das 12 horas foi de 18 e 21%, respectivamente, valor acima do encontrado para os carvões de origem vegetal. O experimento controle mostrou que ao longo do tempo de 24 horas, as perdas de MIB ficaram entre 5 (2 horas de contato) e 27% (24 horas de contato). Para o composto

geosmina os resultados variaram de 7 (2 horas de contato) a 29% (24 horas de contato).

Isotermas de Freundlich

As concentrações iniciais utilizadas para os cálculos das Isotermas de Freundlich foram determinadas a partir do experimento controle, onde foi aplicada uma concentração de 1200 ng.l⁻¹ de MIB e geosmina, nenhuma dose de carvão e tempo de duas horas de contato para os carvões de madeira e casca de coco e 12 horas para o carvão de osso. A Tabela 3 mostra as concentrações iniciais (controle) e os valores residuais de MIB e geosmina na aplicação de seis doses de cada um dos CAGs.

Tabela 3: Concentrações iniciais (controle) e residuais de MIB e geosmina na aplicação de seis doses dos carvões de madeira, casca de coco e osso.

Doses de CAG (mg.l ⁻¹)	Residual de MIB (ng.l ⁻¹)			Residual de geosmina (ng.l ⁻¹)		
	Madeira	Coco	Osso	Madeira	Coco	Osso
0 (controle)	1157,0	1154,5	1161,5	1105,0	1089,0	1084,0
5	202,5	220,0	295,0	156,0	84,5	287,0
10	136,5	78,5	114,0	100,5	51,0	101,0
15	78,0	47,0	71,5	63,5	23,5	69,5
20	34,5	39,0	67,5	56,0	18,0	65,5
30	18,0	36,0	64,5	48,0	17,5	63,0
50	9,5	14,5	62,0	31,5	10,0	67,0

O processo de adsorção dos compostos causadores de gosto e odor em CAG indicou uma porcentagem de remoção acima de 70% para os três CAGs testados neste estudo. Os carvões de madeira e casca de coco removeram cerca de 99% dos compostos MIB e geosmina, respectivamente. A máxima remoção dos compostos para o carvão de osso foi de cerca de 94%. Mesmo com a elevada remoção, o carvão de madeira foi o único que reduziu a concentração de MIB abaixo do limite de detecção olfativa (LDO), isto é, abaixo de 10 ng.l⁻¹ com uma dose de 50 mg.l⁻¹. O carvão de casca de coco foi o único que reduziu para 10 ng.l⁻¹ o composto geosmina. O carvão de osso apresentou o pior desempenho na remoção dos compostos causadores de gosto e odor em águas livres de competidores pelos sítios de adsorção.

De acordo com Lalezary *et al.* (1986) e Baker *et al.* (1994), os CAs em geral apresentam menor capacidade de adsorção do composto MIB quando comparado à geosmina. No presente estudo foi encontrado para o carvão de madeira essa mesma tendência na aplicação de 5, 10 e 15 mg.l^{-1} . Quando a dose de carvão aumentou para 20, 30 e 50 mg.l^{-1} , aconteceu uma inversão, sendo que o carvão de madeira apresentou menor capacidade de remoção do composto geosmina, não atingindo valores abaixo do LDO. A capacidade de adsorção do carvão de casca de coco seguiu a tendência de maior dificuldade de remoção de MIB para as seis doses de carvão. Os resultados de remoção de MIB e geosmina do carvão de osso indicaram uma tendência a maior remoção de geosmina, apesar dos valores serem muito próximos para os dois compostos.

As curvas isotérmicas dos compostos MIB e geosmina são mostradas nas Figuras 1 e 2, respectivamente, para os carvões de madeira, casca de coco e osso.

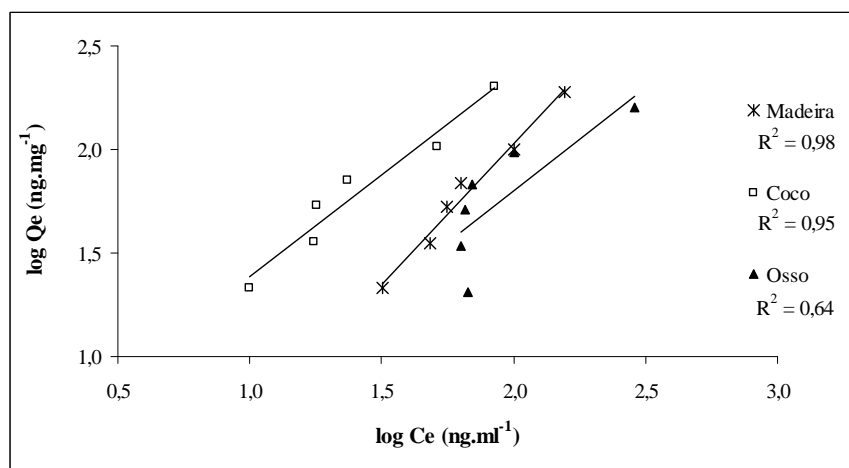


Figura 1 - Isotermas de Freundlich para os carvões de madeira, casca de coco e osso na remoção de MIB.

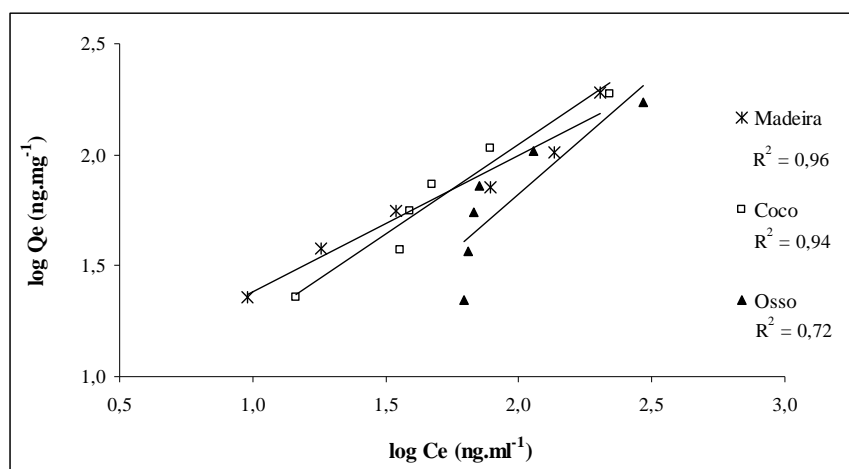


Figura 2 - Isotermas de Freundlich para os carvões de madeira, casca de coco e osso na remoção de geosmina.

A partir das curvas isotérmicas calculou-se as constantes K e n que caracterizam o processo de adsorção (Tabela 4). A constante K está relacionada com a capacidade do CAG reter os compostos MIB e geosmina, enquanto a constante n relaciona-se com a força de ligação entre os agentes da adsorção, isto é, entre MIB e geosmina e os CAGs. Segundo Brandão e Silva (2006), a constante K é o parâmetro mais adequado para comparar os CAGs, pois foi obtida a partir do intervalo de dados adquiridos no experimento.

Tabela 4: Constantes K e n obtidas a partir das Isotermas de Freundlich para os carvões de madeira, casca de coco e osso na remoção dos compostos MIB e geosmina.

CAG	$K(\text{ng. mg}^{-1} \cdot (\text{l. mg}^{-1})^{1/n})$	n	R^2
	MIB		
Madeira	6,0	1,6	0,96
Coco	2,7	1,2	0,94
Osso	1,5	1,2	0,83
Geosmina			
Madeira	0,2	0,7	0,98
Coco	2,6	1,0	0,95
Osso	1,6	1,2	0,80

O carvão de madeira pode ser considerado com a maior capacidade adsorptiva de MIB ($K = 6,0 (\text{ng/mg})(\text{l/mg})^{1/n}$), seguido dos carvões de casca de coco e osso. O carvão de madeira também apresentou o maior valor de n (1,6), indicando uma maior irreversibilidade do processo de adsorção. Para o composto geosmina, o carvão de casca de coco apresentou o maior valor de K ($2,6 (\text{ng/mg})(\text{l/mg})^{1/n}$). Os resultados baseados nos valores da constante K coincidem com as capacidades dos carvões de madeira e casca de coco reduzirem as concentrações de MIB e geosmina, respectivamente, abaixo do LDO.

Segundo Chen *et al.* (1997), as isotermas obtidas com água livre de competidores representam precisamente os resultados para os carvões analisados, uma vez que um único teste, como o número de iodo, foi inconsistente para avaliar a capacidade de remoção de um CA. Para Newcombe *et al.* (1994), as características como área superficial e volume de microporos podem não ser adequadas para determinar *a priori* qual CAG tem melhor capacidade adsorptiva. No presente estudo, esse fato foi corroborado pela não coincidência dos resultados de número de iodo, área superficial BET, porcentagem de volume de microporos totais e da constante K ,

da isoterma de Freundlich, na classificação do carvão com maior capacidade adsorptiva (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação da capacidade de adsorção dos CAGs de madeira, casca de coco e osso por quatro diferentes características.

Carvão	Nº Iodo ^a	Área Superficial BET ^b	% Volume de microporos ^b	Constante K^c	
				MIB	geosmina
Madeira	2	2	1	1	3
Coco	1	1	2	2	1
Oso	3	3	3	3	2

^a Ver dados Tabela 1.

^b Ver dados Tabela 2.

^c Ver dados Tabela 4.

A não coincidência da classificação dos três CAGs, em relação à capacidade de adsorção de cada um, reforça que a escolha adequada do carvão na remoção dos compostos MIB e geosmina não deve ser feita através de um único parâmetro isolado e que a utilização da constante K refletiu mais fielmente os reais resultados da capacidade adsorptiva.

Conclusões

Com os resultados dos experimentos realizados neste estudo pode-se concluir que:

- Com o aumento da dosagem de CAG verificou-se um aumento na remoção de MIB e geosmina, o que reforça a importância da escolha do carvão ativado mais apropriado para remoção de compostos causadores de gosto e odor, exigindo a realização de ensaios experimentais específicos pelas ETAs. Para isso, é preciso levar em consideração a dose do carvão, tempo de contato e os valores das constantes experimentais determinadas para o sistema adsorvato – adsorvente, garantindo uma maior eficiência na remoção dos compostos MIB e geosmina em águas de abastecimento.
- A capacidade adsorptiva de um CAG foi melhor avaliada pela Isoterma de Freundlich do que pelas características de cada carvão. A análise de um único parâmetro como número de iodo, área superficial BET e porcentagem de microporos

não foi eficiente na escolha do melhor CA na remoção dos compostos causadores de gosto e odor. Este fato foi comprovado pela não coincidência dos resultados de melhor capacidade adsorptiva utilizando quatro diferentes parâmetros para os carvões testados.

- A dose de 50 mg.l^{-1} do CAG de madeira reduziu a concentração de MIB de 1157 para 10 ng.l^{-1} , isto é, atingiu o LDO no experimento de adsorção, com tempo de contato de 2 horas. Este resultado coincidiu com o maior valor da constante K , obtida a partir das Isotermas de Freundlich e também, com a maior porcentagem de microporos totais, dentre os carvões testados.
- A dose de 50 mg.l^{-1} do CAG de casca de coco reduziu a concentração de geosmina de 1089 para 10 ng.l^{-1} , isto é, atingiu o LDO com tempo de contato de 2 horas. Os testes para o carvão mencionado acima mostraram maior valor da constante K , número de iodo e área superficial BET, dentre os demais carvões analisados.
- A constante K , obtida com as curvas isotérmicas, foi o parâmetro mais adequado para expressar a verdadeira capacidade adsorptiva dos três carvões testados, uma vez que os resultados baseados nos valores dessa constante coincidiram com as capacidades dos carvões de madeira e casca de coco reduzirem as concentrações de MIB e geosmina, respectivamente, abaixo do LDO.
- Os CAGs de origem vegetal apresentaram os melhores desempenhos na remoção dos compostos causadores de gosto e odor na água quando comparados ao carvão de origem animal, uma vez que reduziram as concentrações de MIB e geosmina abaixo do LDO.
- Recomenda-se a realização das mesmas análises deste estudo, porém utilizando os compostos MIB e geosmina em água bruta a ser tratada pelas ETAs. Essa água contém substâncias que competem pelos sítios de adsorção ou podem bloquear os poros dos carvões, fazendo com que seja aumentada a dose de CAP a ser aplicada ou reduzido o tempo de vida útil dos filtros de CAG, em episódios de gosto e odor na água de abastecimento.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelos recursos destinados ao Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (Prosab), edital 5, tema 1, ao qual este trabalho esteve vinculado.

Referências

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard practice for determination of adsorptive capacity of activated carbon by aqueous phase isotherm technique - D3860-98. In: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standards on activated carbon*. Philadelphia, 2000. p. 47-49.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Carvão ativado pulverizado – Determinação Granulométrica - MB3412*. Rio de Janeiro, 1991a.
- _____. *Carvão ativado pulverizado – Determinação do Número de Iodo - MB3410*. Rio de Janeiro, 1991b.
- _____. *Carvão ativado pulverizado – Especificações - EB2133*. Rio de Janeiro, 1991c.
- BAKER, P.D.; CUNLIFFE, D.A.; GRAHAM, D.K. Biological Sources of Taste and Odour in the Millbrook-Mannum Water Supply System. Austrália Centre for Water Treatment and Water Quality Research, Salisbury, South Austrália. 1994.
- BENDATI, M.M.; MAIZONAVE, C.R.M.; FACCHIN, J.M.J.; THEWES, M.R.; ADAIME, H.S. 2005. Ocorrência de floração de cianobactéria *Planktothrix mougeotii* no Lago Guaíba em 2004: Atuação do DMAE no abastecimento público. In: *23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Anais...*, Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2005.
- BRANDÃO, C.C.S.; SILVA, A.S. Remoção de cianotoxinas por adsorção em carvão ativado. In: PÁDUA, V.L. (Org.). *Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, 2006. p. 415-465.
- BRASIL, C.P.; BRANDÃO, C.C.S. *Avaliação da remoção de microcistina em água de abastecimento público por diferentes carvões ativados em pó produzidos no Brasil*. In: *23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Anais*, Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2005.
- CHEN, G.; DUSSERT, B.W.; SUFFET, I.H. 1997. Evaluation of granular activated carbons for removal of methylisoborneol to below odor threshold concentration in drinking water. *Water Research*. v. 31, n. 5, p. 1155-1163.
- COELHO, E.R.C.; VAZZOLER, H. Capacidade de adsorção frente as isothermas de Langmuir e Freundlich para atrazina em materiais zeolíticos e carbonosos utilizados em tratamento de água na remoção de matéria orgânica natural e sintética. In: *23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Anais...*, Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, 2005.
- COOK, D.; NEWCOMBE, G.; SZTAJNBOK, P. The application of powdered activated carbon for MIB and geosmina removal: predicting PAC doses in four raw water. *Water Research*. v. 35, n. 5, p. 1325-1333, 2001.
- COUTINHO, A.R.; BARBIERI, F.C.; PAVANI, P.A. Preparação de carvões ativados a partir de fibras de celulose. In: *2º ENCONTRO BRASILEIRO DE ADSORÇÃO*, maio

- de 1998, Florianópolis, Santa Catarina. Anais de trabalhos apresentados, Leonel T. Pinto (editor), p. 139-144, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil, 2000.
- CYBIS, L.F. *et al.* Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: caso represa Lomba do Sabão e lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: ABES. 64p., il. 2006.
- DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B. *Métodos e técnicas de tratamento de água*. 2. ed. São Carlos: Rima, 1565 p. 2005.
- DONATI, C. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Water Research*. v. 28, n. 8, p. 1735-1742, 1994.
- HO, L.; HOEFEL, D.; BOOK, F.; SAINT, C.P.; NEWCOMBE, G. Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmina through sand filters and in bioreactors. *Chemosphere*, v. 66, n. 11, p. 2210-2218, 2007.
- HUANG, W.J.; LAI, C.H.; CHENG, Y.L. Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Science of the Total Environment*. v. 377, n. 2/3, p. 214-223, 2007.
- JOE, W.H.; CHOI, I.C.; BAEK, Y.A.; CHOI, Y.J.; PARK, G.S.; YU, M.J. Advanced treatment for taste and odour control in drinking water: case study of a pilot scale plant in Seoul, Korea. *Water Science and Technology*. v. 55, n. 5, 111-116, 2007.
- KURODA, E.K.; JÚNIOR, E.C.A.; DI BERNARDO, L.; TROFINO, J.C. *Caracterização e escolha do tipo de carvão ativado a ser empregado no tratamento de água contendo microcistinas*. In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL Anais..., Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, 2005.
- LALEZARY, S.; PIRBAZARI, M.; MCGUIRE, M.J. Evaluating activated carbons for removing low concentrations of taste and odour producing organics. *Journal American Water Works Association*. v. 78, p. 76-82, 1986.
- NEWCOMBE, G.; DONATI, C.; DRIKAS, M.; HAYES, R. Adsorption onto activated carbon: electrostatic and non-electrostatic interactions. *Water Supply*, n. 14, 129, 1994.
- NG, C.; LOSSO, J.N.; MARSHALL, W.E.; RAO, R.M. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmina-water system. *Bioresource Technology*. v. 85, p. 131-135, 2002.
- PIETSCH, J.; BORNMANN, K.; SCHMIDT, W. Relevance of intra- and extracellular cyanotoxins for drinking water treatment. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. v. 30, n. 1, p. 7-15, 2002.
- SNOEYINK, V.L. Adsorption of organic compounds. In: LETTERMAN, R.D. *Water Quality and Treatment: a handbook of community water supplies*. New York: American Water Works Association and McGraw Hill, 1990. p. 781-867.
- TANAKA, A.; ORITANI, T.; UEHARA, F.; SAITO, A.; KISHITA, H.; NIIZEKI, Y.; YAKOTA, H.; FUCHIGAMI, K. Biodegradation of a musty odour component, 2-methylisoborneol. *Water Research*. v. 30, n. 3, p. 759-761, 1996.
- UWINS, H.K.; TEASDALE, P.; STRATTON, H. A case study investigating the occurrence of geosmina and 2-methylisoborneol (MIB) in the surface waters of the Hine Dam, Gold Coast, Australia. *Water Science and Technology*. v. 55, n. 5, p. 231-238, 2007.
- YU-HSIANG, S.; TZU-YING, L.; SHANG-DA, H. Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, v. 65, n. 2, p. 518-524, 2005.

Capítulo III

Biodegradação dos compostos causadores de gosto e odor (2-metilisoborneol e geosmina) em manancial de abastecimento de água no Rio Grande do Sul, Brasil



Trabalho apresentado no XXXI CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL – AIDIS, Santiago, Chile, 2008.

Biodegradação dos compostos causadores de gosto e odor (2-metilisoborneol e geosmina) em manancial de abastecimento de água no Rio Grande do Sul, Brasil

Biodegradation of compounds causing taste and odor (2-methylisoborneol and geosmin) in water supply systems, State of Rio Grande do Sul, Brazil

Viviane Berwanger Juliano*

Bióloga pela PUC/RS, Mestre em Oceanografia Biológica pela FURG e doutoranda em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pelo Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IPH/UFRGS).

Luiz Fernando de Abreu Cybis

Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sueli Teresinha Van Der Sand

Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Josemar Luis Stefens

Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

(*) Av. Plínio Brasil Milano 183/09 – Higienópolis – Porto Alegre – RS – CEP: 90520-002 – Brasil. Tel.:+55(51)9905-7460 – Fax: +55(51)3308-7292. e-mail: vivijuliano@hotmail.com

RESUMO

Ações antrópicas como as descargas de efluentes domésticos e industriais têm acelerado o processo de eutrofização das águas, principalmente pelo aporte de fósforo e nitrogênio, resultando na ocorrência de florações de cianobactérias. Uma consequência desses eventos é a alteração no gosto e odor da água devido à emissão dos metabólitos 2-metilisoborneol (MIB) e geosmina que são recalcitrantes aos métodos convencionais de tratamento. Novos processos de remediação de gosto e odor, principalmente em águas utilizadas como mananciais de abastecimento e onde ocorrem florações de cianobactérias, se fazem necessários. O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial de biodegradação de MIB e geosmina, de duas bactérias isoladas de águas do Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. A remoção de cerca de 90% dos compostos estudados, ao longo de 120 horas de experimento, indica um potencial de utilização de bactérias presentes em

águas naturais em processos de filtração biológica. O conhecimento da eficiência da oxidação biológica, como uma nova ferramenta a ser utilizada para remover as substâncias causadoras de gosto e odor, é essencial para garantir um produto de qualidade para os consumidores.

ABSTRACT

Anthropic activities such as domestic and industrial sewage discharges have sped up the eutrophization process of natural waters, especially due to phosphorus and nitrogen levels, which in turn leads to the occurrence of cyanobacteria blooms. As a result, taste and odor of waters are changed because of the release of the metabolites 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin, two compounds that are resistant to conventional water treatment methods. Therefore, it is necessary to develop new processes to reduce taste and odor in water supplies in which cyanobacteria thrive. This study aimed to study the biodegradation potential of MIB and geosmin exhibited by two bacteria isolated from waters of Lake Guaíba, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The removal of approximately 90% of the amount of the compounds within 120 hours of experiment indicates that the bacteria present in natural waters may be successfully utilized in biological purification strategies. The knowledge of the efficiency of biological oxidation can be used as a new tool in the removal of substances causing taste and odor, is essential to ensure quality to water supplies designated for human consumption.

Palavras chave: biodegradação, 2-metilisoborneol, geosmina, manancial de abastecimento.

INTRODUÇÃO

Cianobactérias planctônicas e perifíticas produzem metabólitos intra e extracelulares, 2-metilisoborneol (MIB) e trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol (geosmina), que causam gosto e odor em reservatórios, rios, canais e dentro de plantas de tratamento de água, provocando impactos nos processos de tratamento (Carmichael, 1997). Os compostos MIB e geosmina são de particular importância por serem impalatáveis, e gerar gosto e odor de terra e mofo na água potável

(Westerhoff *et al.*, 2005). Estes compostos são liberados normalmente no final da primavera, em concentrações de 100 ng/l, consideradas altas, e de 10 ng/l, relatadas como baixas, porém já perceptíveis como odores desagradáveis (Lauderdale *et al.*, 2004). Para resolver este problema, processos de tratamento biológico têm sido investigados, devido ao seu baixo custo de operação quando comparados aos tratamentos físicos e químicos, tais como adsorção em carvão ativado e ozonização.

A ocorrência de problemas de gosto e odor na água está amplamente distribuída no mundo, tendo sido reportada na Ásia, Austrália, América do Norte e Europa (Suffet *et al.*, 1996). Segundo Ferreira Filho (1996), pesquisas realizadas pela *American Water Works Association* (AWWA) mostraram que o primeiro critério utilizado pela população na aceitação da água distribuída à mesma é a capacidade desta apresentar ou não odor e sabor.

O Lago Guaíba, localizado na região metropolitana de Porto Alegre, é um importante manancial de abastecimento, propiciando múltiplos usos para suas águas, no que diz respeito às indústrias, atividades econômicas, comerciais, de recreação e ao abastecimento público. Nas últimas décadas, o crescimento urbano e as intensas atividades agrícolas e industriais nessa bacia hidrográfica ocasionaram um comprometimento da qualidade das suas águas. O ano de 2004 foi marcado por um expressivo evento de floração de cianobactérias no Lago Guaíba, favorecido por um intenso período de seca. Nesse evento, as concentrações de MIB e geosmina na água bruta atingiram valores de 1985,0 e 17,0 ng/l, respectivamente, e na água após o tratamento com carvão ativado em pó, 838,0 e 5,5 ng/l (Bendati *et al.* 2005).

Uma vez que grande parte das atuais tecnologias aplicadas no tratamento de água apresenta deficiências, existe a necessidade de desenvolver novas alternativas de tratamento, que sejam viáveis em termos financeiros e operacionais. Assim, é possível prever um grande potencial relativo aos processos de oxidação biológica em relação à remediação de águas contaminadas com metabólitos produzidos por algas e cianobactérias. Por isso, surge a necessidade de estudos sistemáticos, que permitam avaliar o real potencial dos processos, quando direcionados a substratos específicos e representativos dos resíduos em questão.

OBJETIVOS

Caracterizar as bactérias capazes de degradar MIB e geosmina e determinar o potencial de degradação desses metabólitos através da cultura de bactérias na ausência de um substrato sólido.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento das bactérias capazes de degradar MIB e geosmina

Os inóculos foram obtidos a partir da água do Lago Guaíba, manancial de abastecimento de parte da população da cidade de Porto Alegre, visto que este manancial apresenta constantes eventos de florações de cianobactérias e presença de MIB e geosmina. Simultaneamente à amostragem de água para obtenção das bactérias foram medidas as seguintes variáveis físicas e químicas: temperatura da água e do ar, pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, transparência da água, turbidez, carbono total, carbono orgânico, carbono inorgânico, MIB e geosmina.

O experimento de enriquecimento e cultura das bactérias seguiu o procedimento adotado por Lauderdale *et al.* (2004) com modificações:

Montagem dos sistemas: Sistema 1 e 2 (duplicata) e Sistema 3 (controle):

- Volume de água do Lago Guaíba: 1800 ml para cada sistema
- Para o Sistema 3 (controle) a água foi previamente autoclavada para eliminar os microrganismos
- Quantidade de carvão antracitoso no filtro: 60g para cada sistema
- Concentração de MIB e geosmina acrescentada à água: 2000 ng/l para cada sistema
- Colunas montadas em capela de fluxo laminar

A solução contendo água do Lago Guaíba mais MIB e geosmina foi bombeada, em cada sistema, com bombas peristálticas e fluxo de aproximadamente 2,0 ml/min, durante sete dias. Essas colunas de vidro possuem 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro e são acopladas a reservatórios na parte superior,

com capacidade para 800 ml cada e outro reservatório na parte inferior com capacidade de 1800 ml cada.

Após o crescimento do biofilme, o carvão de cada um dos sistemas foi retirado do filtro e colocado em frascos contendo água peptonada e agitados por 30 minutos e 150 rpm para desagregar as bactérias.

Seleção das bactérias capazes de degradar MIB e geosmina

As culturas de bactérias foram primeiramente obtidas a partir de 100µl da concentração original (10^0) e das diluições seriadas em água peptonada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), contendo o biofilme dos Sistemas 1 e 2. Em seguida, procedeu-se o plaqueamento das diluições, através da técnica de espalhamento em superfície com alça de Drigalsky, nos meios de cultura, meio mineral contendo MIB e geosmina na concentração de 2 µg/l e ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas a 37°C por 3 dias e, após esse período as colônias (unidades formadoras de colônias - UFC) foram contadas. O isolamento das colônias foi realizado em placas contendo meio mineral mais MIB e geosmina na concentração de 10 µg/l como única fonte de carbono.

Caracterização das culturas isoladas

Após o desenvolvimento das colônias puras, foi observada sua morfologia e realizada a caracterização por coloração de Gram e provas bioquímicas.

Potencial de degradação de MIB e geosmina

Este experimento foi realizado para verificar a capacidade das bactérias degradarem MIB e geosmina na ausência de um substrato sólido. Os testes foram realizados no aparelho Banho de Água, com agitação de 140 rpm e temperatura de 30°C. As soluções foram preparadas com 30 ml de meio mineral, 3 ml de pré-inóculo e concentrações de 1 µg/l de MIB e geosmina. O pré-inóculo de cada bactéria foi obtido pela raspagem parcial da colônia, mantida em meio mineral inclinado, e colocada em 30 ml de meio mineral líquido com 10 µg/l de MIB e geosmina, agitação de 140 rpm, temperatura de 30°C por 72 horas. Após esse período de crescimento,

o pré-inóculo foi centrifugado, lavado e ressuspendido em solução de 40 ml de meio mineral mais MIB e geosmina na concentração a ser testada.

A biodegradação foi avaliada em duplicata a cada 24h por 120 horas. A massa celular bacteriana foi determinada pela medida do peso seco, sendo que o tempo zero indicou a biomassa inicial. Para cada tempo testado foi incluído um controle químico, contendo somente a solução de meio mineral mais MIB e geosmina, para determinar a porcentagem de perda dos compostos na ausência dos microrganismos.

Análise das concentrações de MIB e geosmina

As soluções estoque de MIB e geosmina foram obtidas a partir de padrões (Wako Chemical) na concentração de 100 mg/l. O padrão interno *cis*-decahidronaftol foi utilizado para a quantificação das amostras. A determinação das concentrações residuais de MIB e geosmina foi realizada por cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massa (GCMS) através de alíquotas de 30 ml de amostra, filtrada previamente em filtro de membrana de 0,22 µm para eliminar os microrganismos. O método utilizado foi o de microextração em fase sólida (SPME) para extração dos compostos odoríferos das amostras de água e subsequente análise no GCMS - GC 3800 Varian Saturn 2000 (Yu-Hsiang *et al.*, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A água contendo os inóculos de bactérias apresentou características de uma floração: alta densidade de cianobactérias ($2,0 \times 10^5$ cel/ml), cor esverdeada e elevada concentração de MIB (1033 ng/l), liberando forte cheiro de terra no ambiente. O valor de geosmina detectado, 6 ng/l, ficou abaixo do limite de percepção como odor desagradável. A água que circulou nos Sistemas 1, 2 e 3 (controle) foi analisada e os parâmetros medidos constam na tabela 1. As maiores reduções nas concentrações de MIB e geosmina ocorreram nos Sistemas 1 e 2, coincidindo com a formação do biofilme. Os valores foram reduzidos para 32 e 35 ng/l de MIB e geosmina, respectivamente, onde a concentração total no início do experimento foi de 3033 ng/l de MIB e 2006 ng/l de geosmina. Estes resultados podem indicar o

consumo dos compostos causadores de gosto e odor pelas bactérias e/ou adsorção no carvão antracitoso.

Tabela 1: Parâmetros ambientais da água do Lago Guaíba durante a coleta dos inóculos e após a formação do biofilme.

PARÂMETROS	Características da água			
	Antes da formação do biofilme	Após a formação do biofilme		
		Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
Temperatura ar (°C)	22,4	26,1	26,1	26,1
Temperatura água (°C)	25,0	25,2	25,1	25,0
pH	7,6	6,6	6,6	6,9
Condutividade mS/cm	0,135	0,193	0,178	0,173
Oxigênio dissolvido (mg/l)	8,2	7,5	7,0	7,1
MIB (ng/l)	1033,0	32,0	16,0	762,0
Geosmina (ng/l)	6,0	35,0	14,0	226,0
Turbidez (NTU)	44,9	1,3	1,0	8,5
Carbono Total (mg/l)	0,39	3,04	5,92	2,35
Carbono Orgânico (mg/l)	0,37	1,76	1,36	2,11
Carbono Inorgânico (mg/l)	0,02	1,28	4,56	0,24
Transparência (cm)	10,0	-----	-----	-----

As contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) nos Sistemas 1 e 2, em ágar padrão para contagem, foram de $1,25 \times 10^6$ e $2,7 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente. Desse total de bactérias obtidas após a formação do biofilme no processo de isolamento, 15 colônias foram caracterizadas como consumidoras de MIB e geosmina, visto que passaram por seis esgotamentos em meio mineral sólido mais os compostos na concentração de $10 \mu\text{g/l}$, sendo os metabólitos a única fonte de carbono para o crescimento bacteriano.

As células foram coradas pela coloração de Gram, comprovando a pureza das culturas, caracterizando as bactérias em Gram⁺ ou Gram⁻ e com relação a sua forma e arranjo. Das 15 colônias, 13 foram classificadas como Gram⁺ e duas Gram⁻. As formas de coco, bacilo e bacilo com esporo foram observadas durante a caracterização das colônias. Para a realização dos testes de biodegradação foram escolhidas duas bactérias: F1, caracterizada como bacilo com esporo Gram⁺ e pertencente ao gênero *Bacillus*, e F2 um bacilo Gram⁻.

A biodegradação dos compostos MIB e geosmina por duas bactérias isoladas indica o potencial desses microrganismos para serem utilizados na remoção das substâncias causadoras de gosto e odor. Os resultados destes testes são mostrados nas figuras 1 e 2. O tempo zero foi utilizado para determinar as concentrações

iniciais de MIB e geosmina, bem como a massa celular inicial das colônias. Após o tempo de 120 horas de experimento da bactéria F1, as concentrações de MIB baixaram de 1033,0 ng/l para 99,0 ng/l, e geosmina de 990,5 para 60,5 ng/l, indicando um maior consumo do composto geosmina, quando comparado ao composto MIB. A maior massa celular dessa bactéria foi registrada no tempo de 24 horas, coincidindo com a queda de 70% na concentração de geosmina, não ocorrendo o mesmo com o composto MIB. Estes resultados fornecem um indício de preferência do consumo inicial de geosmina por esta espécie de *Bacillus*.

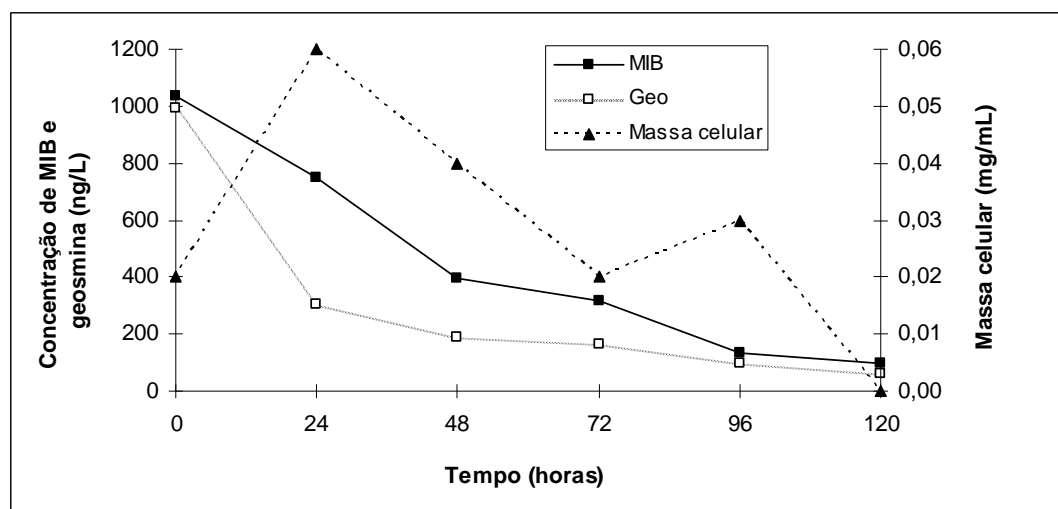


Figura 1: Concentrações residuais de MIB e geosmina e massa celular da bactéria F1 após o processo de biodegradação.

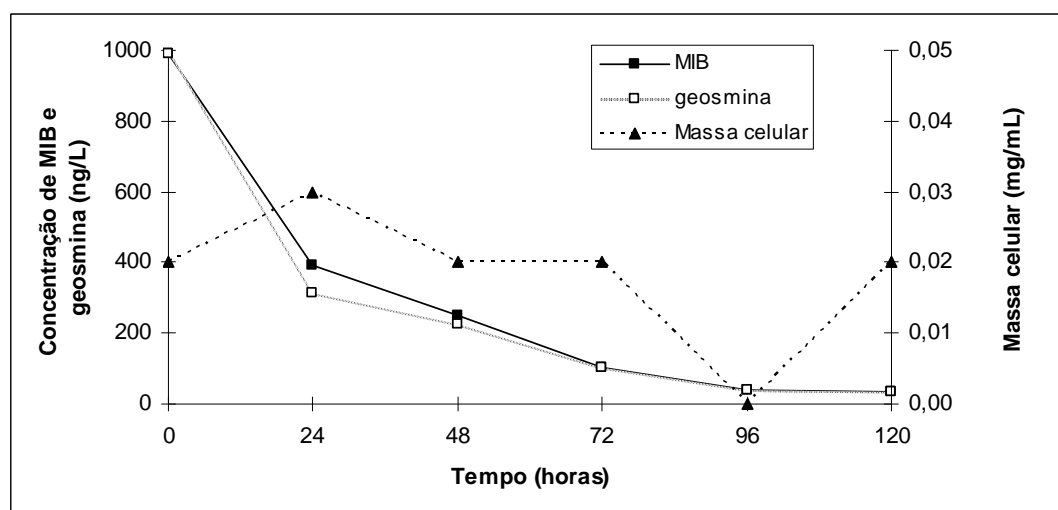


Figura 2: Concentrações residuais de MIB e geosmina e massa celular da bactéria F2 após o processo de biodegradação.

A figura 2 mostra a biodegradação, utilizando a bactéria F2, bacilo Gram⁻. Essa bactéria removeu o composto MIB de 991,0 para 35,0 ng/l e geosmina de 988,0 para 33,0 ng/l. Os valores foram bastante próximos não indicando preferência de consumo entre os compostos analisados. Assim como para a bactéria F1, a maior massa celular foi registrada no período de 24 horas, coincidindo com o consumo de 60 e 68 % de MIB e geosmina, respectivamente. No tempo de 96 horas não foi detectada a biomassa bacteriana, provavelmente, por algum erro na pesagem do filtro, pois no tempo de 120 horas a massa celular foi de 0,02 mg/ml.

Os resultados dos controles químicos, contendo somente a solução de meio mineral mais as concentrações iniciais de 1038,0 ng/l de MIB e 1006,0 ng/l de geosmina para a bactéria F1 e 994,0 ng/l de MIB e 991,0 ng/l de geosmina para a bactéria F2, estão apresentados nas figuras 3 e 4. As perdas totais ao longo das 120 horas de experimento chegaram a 10,5 % para o composto MIB e 8,7 % para a geosmina no processo de biodegradação da bactéria F1. No experimento da bactéria F2, as perdas foram de cerca de 7,0 % para MIB e 8,0 % para geosmina.

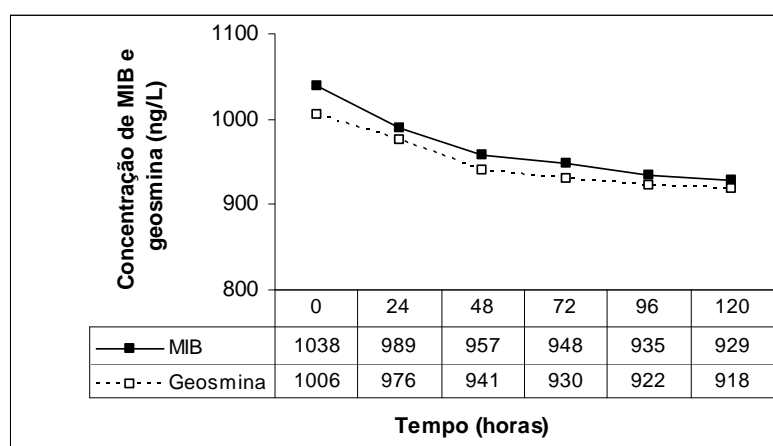


Figura 3: Concentrações residuais de MIB e geosmina no experimento controle do processo de biodegradação da bactéria F1.

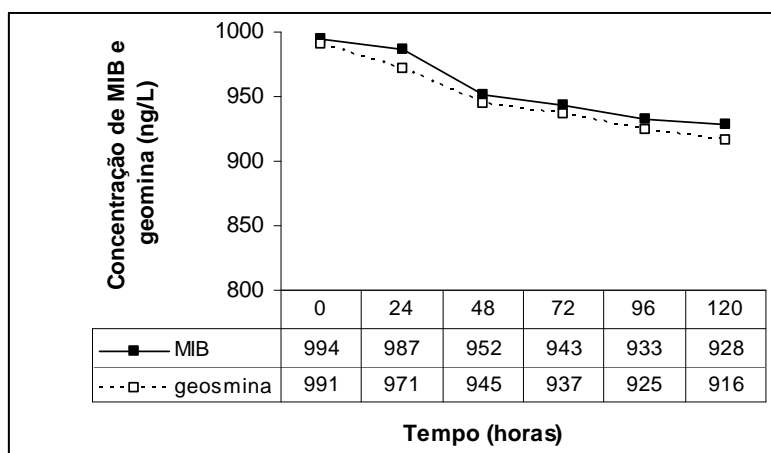


Figura 4: Concentrações residuais de MIB e geosmina no experimento controle do processo de biodegradação da bactéria F2.

A partir das concentrações iniciais e residuais de MIB e geosmina e dos resultados dos controles químicos, nos experimentos de biodegradação das bactérias F1 e F2, calculou-se a porcentagem de remoção dos compostos causadores de gosto e odor, por bactérias isoladas do ambiente na ausência de um substrato sólido (Figuras 5 e 6). A bactéria F1 removeu 89,0 % de MIB e 93,0 % de geosmina, enquanto que a F2 removeu cerca 96,0 % tanto de MIB como de geosmina, a partir da concentração inicial. A porcentagem final de remoção dos compostos para as duas bactérias foi semelhante, indicando a possibilidade de utilizar bactérias previamente conhecidas em filtros biológicos, como um método avançado na remoção de gosto e odor em sistemas de tratamento de água.

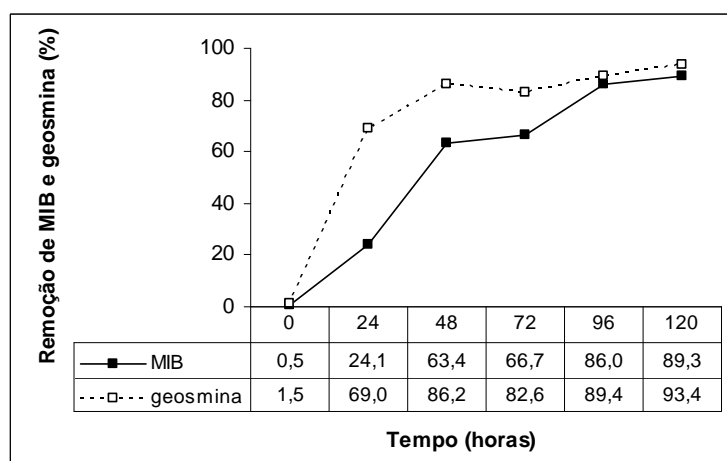


Figura 5: Porcentagem de remoção dos compostos MIB e geosmina no processo de biodegradação da bactéria F1.

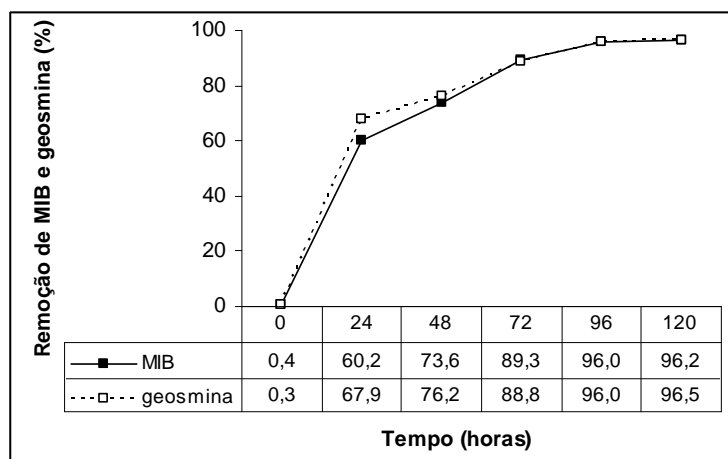


Figura 6: Porcentagem de remoção dos compostos MIB e geosmina no processo de biodegradação da bactéria F2.

Lauderdale *et al.* (2004) também tiveram como objetivo verificar a remoção de MIB, por bactérias isoladas de um lago local, na ausência de um substrato sólido. Com a utilização de concentrações na faixa de mg/l, a remoção de MIB chegou a 57% da concentração inicial, após 72 horas. Estes valores foram semelhantes aos encontrados no presente estudo para a remoção de MIB, com o mesmo tempo de biodegradação realizado pela bactéria F1, que também pertence ao gênero *Bacillus*.

Nos experimentos com baixas concentrações (25,0 ng/l), consideradas ambientalmente relevantes, os autores encontraram uma remoção de 66%, após 96 horas, atingindo valores abaixo do limite de detecção olfativa. No presente estudo, encontrou-se uma remoção acima da encontrada por esses autores, 96% da concentração inicial de 1 µg/l de MIB, porém o residual ficou acima do limite de detecção (10 ng/l).

Os testes com diferentes faixas de concentração de MIB não indicaram diferença significativa nas porcentagens de remoção, utilizando concentrações de mg/l e ng/l, nos estudos de Lauderdale *et al.* (2004). Entretanto, estudos anteriores como o de Izaguirre *et al.* (1988) mostraram que culturas mistas de bactérias foram capazes de degradar o composto MIB na concentração inicial de 0,29 µg/l para valores abaixo do limite de detecção, na metade do tempo exigido para degradar concentrações de 2,0 mg/l. Resultado semelhante também foi demonstrado por Egashira *et al.* (1992), onde um isolado caracterizado como *Bacillus*, utilizado em filtros biológicos, apresentou maior potencial de degradação de MIB com o aumento da concentração inicial do composto. Com os antecedentes bibliográficos

pesquisados é possível notar uma variedade de resultados, que ainda precisam ser elucidados. Cabe ressaltar que os trabalhos utilizando, simultaneamente, os dois compostos causadores de gosto e odor, MIB e geosmina, são raros e de grande pertinência, visto que os metabólitos das cianobactérias podem ocorrer concomitantemente em águas naturais.

CONCLUSÕES

A elevada concentração de MIB e a detecção do composto geosmina na água do Lago Guaíba, durante o evento de floração registrado em março de 2008, favoreceu o desenvolvimento de uma comunidade bacteriana capaz de degradar os metabólitos causadores de gosto e odor. Neste estudo, o sucesso do processo de isolamento foi comprovado pelo cultivo de 15 bactérias, as quais utilizaram como fonte de carbono para seu crescimento, somente MIB e geosmina. Estas bactérias, presentes em águas naturais, podem exercer uma importante função na ciclagem dos compostos MIB e geosmina, durante eventos sazonais de florações de cianobactérias.

Com o conhecimento das remoções dos compostos MIB e geosmina por duas bactérias, denominadas de *Bacillus* sp e bacilo Gram⁻, demonstrado neste estudo e em função dos antecedentes bibliográficos pesquisados, é possível prever um grande potencial dos processos de biodegradação, com culturas de bactérias conhecidas. A remediação dos problemas de gosto e odor em águas contaminadas com metabólitos produzidos por cianobactérias, ajudará no fornecimento de uma água com melhor qualidade para a população.

Agradecimentos. – *Este trabalho teve suporte financeiro da FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos e CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, no Programa de Pesquisa em Saneamento Básico - PROSAB.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Public Health Association (APHA), (2001). *Standard methods for the examination of water and wastewater, twentieth ed.* American Public Health Association, Washington, DC.

Carmichael, W.W. (1997). *The cyanotoxins.* Adv. Botanical Res. 27, 211-256.

Bendati, M.M., Maizonave, C.R.M., Facchin, J.M.J., Thewes, M.R., Adaime, H.S. (2005). Ocorrência de floração de cianobactéria *Planktothrix mougeotii* no Lago Guaíba em 2004: Atuação do DMAE no abastecimento público. In: *23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005, Campo Grande, MS.* p. 412-413.

Egashira, K., Ito, K., Yoshiy, Y. (1992). Removal of musty odor compounds in drinking water by biological filter. *Water Science and Technology.* Vol. 25, 307-314.

Ferreira Filho, S.S. (1996). Otimização da aplicação do carvão ativado em pó no tratamento de água visando a redução de compostos orgânicos causadores de odor e sabor em águas de abastecimento, *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 1 (4), 131-143.

Izaguirre, G., Wolfe, R.L., Means, E.G. (1988). Bacterial degradation of 2-methylisoborneol. *Water Science and Technology*, vol. 20, 8/9, 205-210.

Lauderdale, C.V., Aldrich, H.C., Lindner, A.S. (2004). Isolation and characterization of a bacterium capable of removing taste and odor causing 2- methylisoborneol from water. *Water Research*, vol. 38, 4135-4142.

Suffet, I. H., Corado, A., Chou, D., Maguire, M, Butterworth, S., (1996). AWWA taste and odor survey. *Journal American Water Works Association*, vol. 88, 4, 166-180.

Westerhoff, P., Rodriguez-Hernandez, M., Sommerfeld, M. (2005). Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs. *Water Research*, vol. 39, 4899-4912.

Yu-Hsiang, S., Tzu-Ying, L., Shang-Da, H. (2005). Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, vol. 65, 2, 518-524.

Capítulo IV

Removal of 2-methylisoborneol and geosmin from water by bacteria: isolation, identification and biodegradation potential



Artigo a ser submetido à Revista Biodegradation

Removal of 2-methylisoborneol and geosmin from water by bacteria: isolation, identification, and biodegradation potential

Viviane Berwanger Juliano¹, Luiz Fernando Cybis¹, Paola Barbosa Sironi, Sueli Van Der Sand²

¹ Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IPH/UFRGS).

² Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Corresponding author: Av. Plínio Brasil Milano 183/09 – Higienópolis – Porto Alegre – RS – CEP: 90520-002 – Brazil. Tel.:+55 (51) 9905-7460 – Fax: +55 (51) 3308-7292. e-mail: vivijuliano@hotmail.com

Abstract

The earthy-musty taste and odor of the compounds 2-methylisoborneol and geosmin, derived from cyanobacteria, occur in some natural waters, and are recalcitrant to conventional water-treatment methods. These metabolites have been implicated in causing unpalatable drinking water around the world. Therefore, it is necessary to develop new processes to reduce taste and odor in water supplies affected by cyanobacteria. MIB and geosmin are susceptible to biodegradation by a variety of microorganisms. The purpose of this study was to evaluate the biodegradation potential of MIB and geosmin by means of bacteria isolated from the water of Lake Guaíba in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The molecular identification of the isolates distinguished six different genera that were capable of degrading MIB and geosmin compounds in the absence of a solid substrate. The removal of approximately 90% of the compounds during a 48-hour experiment period indicated that bacteria present in natural waters can be successfully utilized in biological purification strategies in water-treatment plants.

Keywords: biodegradation, 2-methylisoborneol, geosmin, water supply.

Introduction

Off-flavor episodes have become a common problem in freshwaters worldwide, especially in eutrophic lakes and reservoirs. These nuisance cases have resulted in large economic losses to the aquaculture industry, negative impacts to the aesthetic quality of many tourist sites, consumer complaints about drinking water, and increased cost of water treatment (Li et al. 2007). The occurrence of taste and odor problems in drinking water is widespread and has been reported in Asia, Australia, North America, and Europe (Suffet et al. 1996).

Of major concern to the water industry are the intra- and extracellular metabolites 2-methylisoborneol (MIB) and trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol (geosmin), which are produced by cyanobacteria and typically released from late spring through early fall, in concentrations reported to be as high as 100.0 ng/l (Izaguirre et al. 1988b). Such compounds are among the most prevalent metabolites that impart earthy-musty tastes and odors in reservoirs, rivers, and canals, and within water-treatment plants (Carmichael 1997). Concentrations as low as 10.0 ng/l can cause malodorous drinking water (Lauderdale et al. 2004). The biological function of MIB and geosmin is unknown, although they may be intermediates or by-products of pigment production (Zimba et al. 1999).

The production of MIB and geosmin has been linked to cyanobacteria blooms and consequently to several environmental factors affecting such blooms, such as nitrogen and phosphorus concentrations (Uwins et al. 2007), irradiance, water quality (Falconer, 2005), or air and water temperature (Tung et al. 2008).

These metabolites are somewhat recalcitrant to conventional water treatment (Rittmann et al. 1995; Nerenberg et al. 2000). Powdered activated carbon and oxidants such as chlorine, chloramines, potassium permanganate, and occasionally ozone have shown limited utility in treatment of waters containing MIB and geosmin (Lalezary et al. 1986). These compounds are susceptible to biodegradation, and several studies have reported a variety of microorganisms responsible for their removal from water (Ho et al. 2007). This susceptibility can be attributed to their structures, which are similar to biodegradable alicyclic alcohols and ketones (Rittmann et al. 1995). The biodegradability of MIB and geosmin indicates that there is potential for using biological filtration processes as a viable treatment option for removing taste and odor compounds in water (McDowall et al. 2009).

In recent years, urban growth and intensive agricultural and industrial activities have caused an impairment of the water quality of Guaíba Lake, located in the metropolitan region of Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil (29°55' - 30°37'S and 50°56' - 51°46'W). The year 2004 was marked by a significant cyanobacteria bloom event in the lake — which is an important source of water supply, with intense and diverse industries and economic activities, apart from recreation and public supply — favored by an intense period of drought. During that event, the raw water of Guaíba Lake experienced levels of 1985.0 and 17.0 ng/l of MIB and geosmin, respectively. After treatment with powdered activated carbon, the levels of these compounds decreased to 838.0 ng/l of MIB and 5.5 ng/l of geosmin (Bendati et al. 2005), but still higher than the odor threshold concentration (OTC) of 10.0 ng/l.

Biological oxidation processes may have good potential for the remediation of water contaminated with MIB and geosmin metabolites, since the conventional water-treatment processes applied to remove taste- and odor-causing compounds are not completely efficient. The aims of this study were to isolate bacteria from the natural water, identify these microorganisms, and evaluate the biodegradation potential of MIB and geosmin compounds by pure culture of bacteria, in the absence of a solid substrate.

Material and methods

Environmental water sampling

The source of inoculum used in this study was the water from Guaíba Lake. This water body experiences periods of large cyanobacteria blooms, resulting in taste and odor events. Three liters of surface water were collected from two locations in the lake in different periods. The first sample was collected when Guaíba Lake had low concentrations of MIB and geosmin and no cyanobacteria bloom. Water was collected from a depth of 15 cm, and this sample was called P1. The water sample P2 was collected from a shallow area of the lake, during an intense bloom of cyanobacteria, with a high concentration of MIB. The water samples were collected in sterile glass bottles, and then stored at 4°C until their use in enrichment experiments.

Physical and chemical measurements were performed *in situ*: water and air temperature, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity, and transparency of

water. Turbidity, total carbon, organic carbon, inorganic carbon, MIB, and geosmin were measured at the laboratory. For the quantitative study of cyanobacteria in Guaíba Lake water, samples were collected at a depth between 10 and 20 cm, preserved with Lugol solution (100 g KI + 50 g. I₂ in 100 ml H₂O), and kept under refrigeration until their analysis. The quantitative analysis was performed with the aid of an Opton inverted microscope, and the density of cyanobacteria (cells/ml) was estimated according to Utermöhl (1958).

Enrichment and isolation of MIB and geosmin-degrading bacteria

Enrichment procedures and routine culturing were performed according to Lauderdale et al. (2004), with some modifications. The experimental filtrate apparatus used for biological growth was composed of three glass columns, each one 10 cm in length and 3 cm in diameter, packed with 60 g of the anthracite, coupled to one reservoir at the top, with a capacity of 800 ml, and another one at the bottom, with a capacity of 1800 ml. Each of the columns was connected to a peristaltic pump to maintain the flow of solution through the column and the upper and lower reservoirs, forming a closed system.

In this study, two experiments were performed. Both experiments I and II used water samples from P1 and P2, respectively. Each experiment employed a solution of 1800 ml of Guaíba Lake water, and MIB and geosmin at 2.0 µg/l target concentrations were added. These solutions were pumped into each column at an approximate flow rate of 2.0 ml/min, during 10 days for Experiment I and 7 days for Experiment II. In each experiment, biological growth occurred on the anthracite. The MIB and geosmin concentrations were chosen because they represented the average of concentrations reported previously in different studies (Izaguirre et al. 1988a; Lauderdale et al. 2004; Hoefel et al. 2006).

One of the columns of the filtration apparatus was used as the control. This control test was also run under the same operational conditions as the other two columns, using only water from Guaíba Lake, previously autoclaved, and with MIB and geosmin compounds added.

After biofilm growth, the anthracite was removed from each column, and was added to Erlenmeyer flasks containing peptone water and MIB and geosmin, with a final concentration of 2.0 µg/l each. These flasks were sealed and incubated in a

shaker at 30°C at 150 rpm for 30 min to detach the biofilm. The resulting supernatant, containing bacteria from the biofilm, was used as an inoculum to obtain bacteria capable of degrading MIB and geosmin. The supernatant was used for serial dilutions, and all dilutions were spread on plates containing mineral medium (MM) (NH₄Cl 50 mg/l, K₂HPO₄ 100 mg/l, MgSO₄ 50 mg/l, CaCl₂ 20 mg/l, FeCl₃ 1 mg/l and agar) and MIB and geosmin at a final concentration of 2.0 µg/l, and on plates containing Standard Plate Count Agar (PCA). All plates were subsequently incubated at 30°C for 24 - 48 h. After this period, the colonies from the PCA medium were counted, and the results expressed in Colony Forming Units (CFU) per ml.

The pure cultures were obtained after several isolations onto agar plates composed of MM plus 10.0 µg/l of MIB and geosmin. The plates were incubated at 30°C for 24 - 48 h. Colonies were spread several times on plates containing MM medium, with MIB and geosmin as the sole carbon sources. After that, the bacteria cells were used for the biodegradation tests.

Characterization of bacteria by 16S rDNA gene sequencing

The genomic DNA of the 13 isolates was extracted following the standard protocol for bacterial genomic DNA preparations (Sambrook et al. 1989). Amplification of 16S rDNA was performed by polymerase chain reaction (PCR). Two universal primers, 8F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') and 518R (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'), were used to amplify products from the 16S rRNA gene. The final working volume was 30 µl. The mixture contained 1 X *Taq* buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of deoxynucleoside triphosphate – dNTPs, 1 U of Platinum *Taq* polymerase Invitrogen, 1.0 µM of primer 8F, 1.0 µM of primer 518R, ultrapure water, and 30 ng of DNA template. After denaturation for 5 min at 94°C, 40 cycles were performed: 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 50°C, and 2 min of extension at 72°C. These cycles were followed by a final elongation for 6 min at 72°C. The amplification products were sequenced in an ABI 3130XL Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems) by the Sequencing Laboratory of ULBRA University. The resulting sequences of isolates were analyzed using Chromas version 1.5 software. The consensus sequence was then compared with a sequence database using BLAST (NCBI) algorithm (Altschul et al. 1990) and querying GenBank (web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Similar

sequences, from previously cultured bacteria obtained from GenBank, were aligned against the DNA sequences of 13 isolated bacteria that degrade MIB and geosmin using ClustalX version 2.0.6 software (Thompson et al. 1997). Neighbor-joining analysis with 1000 bootstrap replicates was then performed using the software program MEGA version 4 - Phylogenetic and molecular evolutionary analyses (Tamura et al. 2007).

Biodegradation potential of MIB and geosmin

Pre-inoculum culture

Erlenmeyers containing 30 ml of MM medium with 10.0 µg/l of MIB and geosmin were inoculated with each bacterium. The suspension was incubated under agitation on a shaker at 30°C for 72 h and 140 rpm. After this period, the culture was centrifuged, washed once in MM to remove residual MIB and geosmin, centrifuged again, and re-suspended in a solution of 40 ml of MM with 1.0 µg/l MIB and geosmin to be tested. This final solution was used as the pre-inoculum.

Biodegradation experiment

The MIB and geosmin depletion potential of the isolated cultures was examined at a concentration of 1.0 µg/l, approximately equal to the concentrations detected during periods of extensive cyanobacteria blooms in Guaíba Lake. Testing at this concentration would ensure the determination of whether this culture is capable of degrading MIB and geosmin at a concentration that includes environmentally relevant levels. This experiment was conducted to assess the ability of bacteria to degrade MIB and geosmin in the absence of a solid substrate. For the biodegradation evaluation, a test was performed in duplicate using 13 bacteria cultures, 7 obtained from Experiment I and 6 from Experiment II.

Erlenmeyers containing 30 ml of MM medium with 1.0 µg/l of MIB and geosmin were inoculated with 3 ml of each pre-inoculum bacterium. The suspension was incubated under agitation on a shaker at 30°C and 140 rpm for 48 h.

A test to quantify the possible abiotic losses of compounds due to physical and chemical degradation in the absence of microorganisms was run concurrently in each biodegradation experiment, using only MM medium with MIB and geosmin.

Analysis of MIB and geosmin compounds

The quantitative analysis of the remaining concentrations of MIB and geosmin was performed by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GCMS), using 30 ml of each sample, previously sterilized by filtration. The method used was the solid phase microextraction (SPME) for extraction of MIB and geosmin compounds from water samples, and subsequent analysis in GCMS - GC 3800 Varian Saturn 2000 (Yu-Hsiang et al. 2005). The stock solutions of MIB and geosmin were obtained from standards (Wako Chemical) at a concentration of 100.0 mg/l, and the internal standard *cis*-decahydro-naftol was used for quantification of samples.

Results and discussion

Guaíba Lake water parameters

Environmental parameters determined during Experiments I and II are shown in Table 1.

Table 1: Physical and chemical variables of Guaíba Lake water during the collection of inocula for Experiment I (P1 - without cyanobacteria bloom) and Experiment II (P2 - with cyanobacteria bloom).

Parameters	Experiment I	Experiment II
Date	16.01.2008	11.03.2008
MIB (ng/l)	21.0	1033.0
Geosmin (ng/l)	3.0	6.0
Air temperature (°C)	33.0	22.4
Water temperature (°C)	28.7	25.0
Water depth	± 2 m	50 cm
Transparency (cm)	60	10
pH	6.5	7,6
Electrical conductivity (mS/cm)	0.072	0.135
Dissolved oxygen (mg/l)	5.8	8.2
Turbidity (NTU)	15.6	44.9
Total carbon (mg/l)	6.57	0.39
Organic carbon (mg/l)	3.51	0.37
Inorganic carbon (mg/l)	3.06	0.02

In this study, we had two conditions: one working with water without a cyanobacteria bloom, Experiment I (P1); and the other with a high concentration of cyanobacteria, Experiment II (P2). The water for P1 was collected at a point where the lake is around 2 m deep, and the sample was taken 15 cm below the surface, probably collecting a bacterial community present in the plankton. In this experiment, the water sample had low concentrations of MIB (21.0 ng/l) and geosmin (3.0 ng/l) and a total cyanobacteria density of 4.5×10^3 cells/ml, indicating no event of cyanobacteria bloom.

The other water sample was collected at the lake shore (P2), where the total depth is about 50 cm, obtaining both the plankton and sediment communities in the sample. A high concentration of MIB was detected (1033.0 ng/l), releasing the characteristic strong earthy odor. The cyanobacteria density was 2.0×10^5 cells/ml, confirming the bloom event. The geosmin concentration in Experiment II was also below the OTC (6.0 ng/l), as in Experiment I (3.0 ng/l).

In this study, the maximum MIB concentration recorded in the waters of Lake Guaíba, 1033.0 ng/l, can be considered high and associated with a low geosmin concentration. Li et al. (2007) observed that dissolved concentrations of MIB in Macun Bay and Haidong Bay (Dianchi Lake) ranged from 0.0 - 130.4 and 0.0 - 32.5 ng/l, respectively. As in this study, the dissolved concentration of geosmin was the lowest, and only exceeded 10.0 ng/l in September and October.

Changes in MIB concentrations have been linked to cyanobacteria density and the warm season (Tung et al. 2008), as also observed in this study. The MIB concentration can be considered to reflect the growth of MIB-producing microorganisms, which occurs mostly during the spring and summer as previously reported (Sugiura et al. 2003, 2004; Westerhoff et al. 2005; Izaguirre et al. 2007; Li et al. 2007; Uwins et al. 2007; Yen et al. 2007).

Bacteria Identification

The isolation success of bacteria capable of degrading MIB and geosmin was confirmed by the culturing of the 13 isolates, in MM medium with the addition of MIB and geosmin as the sole carbon source. The total number of heterotrophic bacteria on PCA medium was 1.2×10^6 CFU/ml and 1.9×10^6 CFU/ml in Experiments I and II, respectively. After several purifications of the colonies on plates containing MM

medium with MIB and geosmin, seven bacteria from Experiment I and six from Experiment II were able to grow in the conditions imposed.

Ishida and Miyaji (1992) and Izaguirre et al. (1988 a, b) also succeeded in isolating bacteria able to grow in MM containing MIB as the sole source of carbon from natural water samples. Izaguirre et al. (1988a) reported that although many bacteria were isolated from various MIB-degrading enrichment cultures, none of them degraded MIB in pure culture. MIB degradation only occurred in mixed cultures consisting of five or more different bacteria. Geosmin degradation was previously reported mostly for Gram-positive bacteria (Silvey et al. 1970; Narayan and Nunez 1974; Saadoun and El-Migdadi 1998). Hoefel et al. (2006) documented the first case of geosmin degradation by a bacterial consortium of three Gram-negative bacteria isolated from a sand-filter column. The data from this study suggested a combination of complementation of metabolic deficiencies, where a bacterium contains all the necessary genes for degradation but requires essential growth factors or nutrients delivered by secondary strains in associated metabolism. In this case, cross-feeding with metabolites from the degradation pathway occurs between members of the consortium. Recently, Hoefel et al. (2009) first reported the isolation and characterization of Gram-negative bacteria capable of degrading geosmin individually.

The present study is the first to demonstrate the individual degradation capacity of different Gram-positive and negative bacteria isolated from natural waters in the presence of both MIB and geosmin compounds in the solution test. The other report of MIB and geosmin degradation in the same sample was cited by Ho *et al.* (2007), who used bacteria from biofilm present in the filter sand. Joe et al. (2007), Ho et al. (2006), and Elhadi et al. (2004) reported biological filtration of both MIB and geosmin compounds.

The analysis of the partial 16S rDNA gene sequences (about 400 bp) of the 13 isolates indicated the presence of six different genera. Table 2 shows the similarities of the sequences from 13 isolates with the sequences available in GenBank, their respective accession numbers, and bootstrap support. These values were obtained by the neighbor-joining phylogenetic tree (Figure 1).

Table 2: Similarity between the bacterial isolates from Guaíba Lake and strains obtained from GenBank after analysis of gene sequences.

Isolate	Strain (GenBank)	Similarity (%)	Accession number	Bootstrap support	Classification ^a
1	<i>Leucobacter</i> sp. <i>L. komagatae</i>	99	GQ359816 AJ746337	99	<i>Leucobacter</i> sp.
2	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Burkholderia</i> sp. <i>B. arboris</i>	100	GU998815 GU966532 AB458219	100	<i>Burkholderia</i> sp.
5	<i>Burkholderia</i> sp. <i>B. cepacia</i> <i>B. vietnamiensis</i>		AB508863 FJ608714 EU563934		
3	<i>Flavobacterium capsulatum</i> <i>Sphingomonas</i> sp.		M59296 EF628247		
4	<i>Klebsiella</i> sp. <i>K. pneumoniae</i>	99	HM195209 GU594313	88	<i>Klebsiella</i> sp.
6	<i>Pantoea</i> sp.	98	AY579154	100	Enterobacteriaceae
7	Enterobacteriaceae bacterium		EF088375		
9	Bacterium E429		EF059832		
8	<i>Caulobacter</i> sp.	98	AM989012	100	<i>Caulobacter</i> sp.
10	<i>C. vibrioides</i> <i>C. segnis</i>		FJ609718 AB023427		
11	<i>Arthrobacter</i> sp.		DQ847127		
12	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	FM209196	71	<i>Sphingomonas</i> sp.
13	<i>Sphingomonas</i> sp.	100	AB255386	96	<i>Sphingomonas</i> sp.

^a Classification of the 13 isolates according to the sequence similarities available in GenBank, and phylogenetic analysis using bootstrap support.

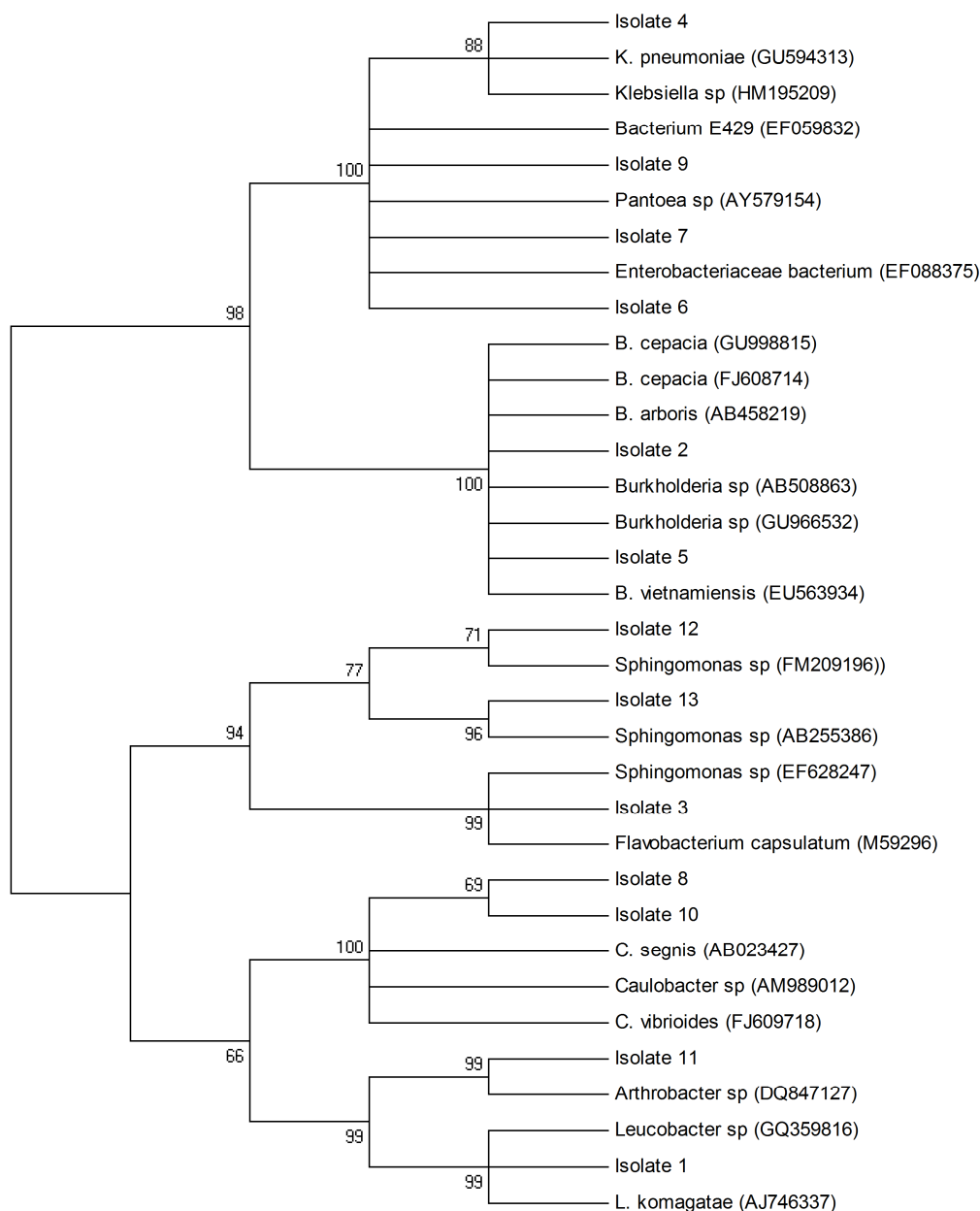


Figure 1: Neighbor-joining phylogenetic tree showing the position of 13 isolates in relation to other closely related genera and/or species. Numerical values on the tree represent bootstrap support.

Although the results are not sufficient to classify the unknown bacteria to species level, it was possible to match nine isolates to genus level (*Leucobacter* sp, *Burkholderia* sp, *Klebsiella* sp, *Caulobacter* sp, *Arthrobacter* sp., and *Sphingomonas* sp). Currently, the sequence similarity threshold between species considering the 16S rDNA gene is 98.7 – 99.0% similarity (Stackebrandt and Ebers 2006).

This study provided the first records of the genera *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Klebsiella*, and *Leucobacter* with the capacity to degrade the MIB and geosmin

compounds, individually, in the absence of a solid substrate. The other genera or family identified in this study have been previously linked to the degradation of MIB or geosmin compounds (Ho et al. 2007).

Biodegradation potential of MIB and geosmin

The biodegradation of MIB and geosmin compounds, after 48 h, by the bacteria growing in submerged cultures, shows the potential of using microorganisms in removing taste- and odor-causing compounds. Comparison of the results of MIB and geosmin degradation to the control samples indicates that there was no abiotic degradation due to physical and chemical factors. The losses of 1.0 and 1.8% of MIB and geosmin, respectively, were determined after 48 h, indicating that these losses resulted from biodegradation by the microorganisms.

The remaining concentrations and percent removal of MIB and geosmin over a 48-h period by each of the 13 isolates are shown in Figure 2.

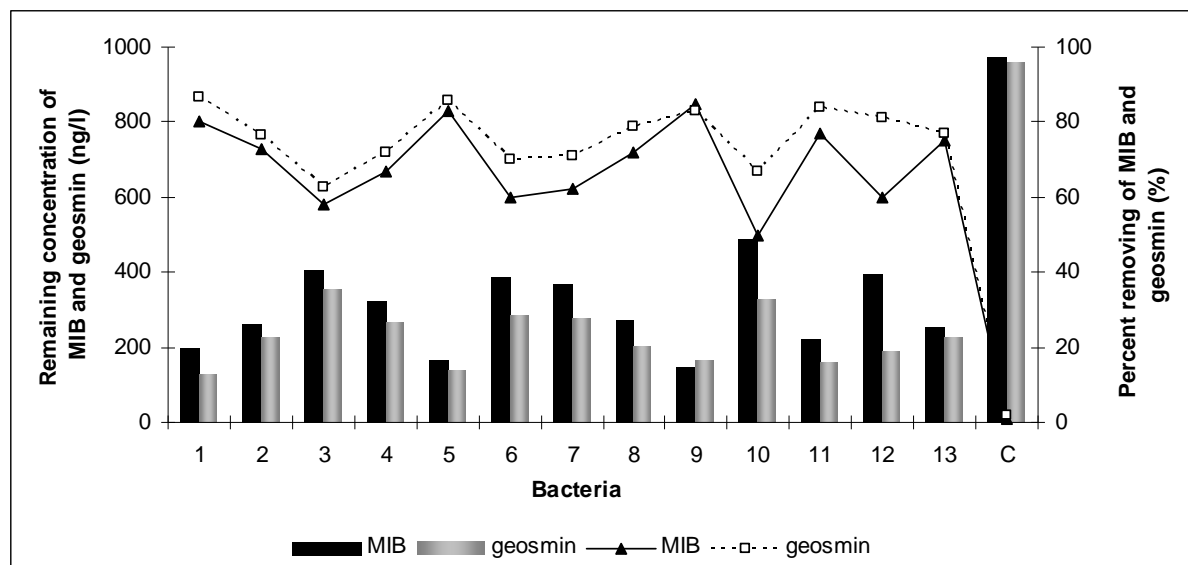


Figure 2: Biodegradation of MIB and geosmin compounds by 13 isolates from Guaíba Lake. The bars represent the concentrations remaining, and the lines the percentage of MIB and geosmin removed after 48 h. The letter C indicates the substrate control without bacteria.

The remaining concentrations of 148.0 to 487.0 ng/l of MIB and 130.0 to 357.0 ng/l of geosmin were obtained with an initial target concentration of 981.0 and 978.0 ng/l of each compound, respectively. Although the degradation did not reach values below the OTC, it corresponded to a reduction of 50 to 86% in MIB and geosmin concentration, over the 48 h. The time allowed for the growth of each isolated bacterium and the lack of nutrients at levels sufficient for the degradation to occur may not have been adequate to reduce MIB and geosmin concentration below the OTC.

Lauderdale et al. (2004) reported that 57% of the initial concentration of MIB (mg/l concentration range) was removed by the strain in a batch system in 72 h of test, and this reduction did not fall below the OTC. In the experiments with low concentrations of MIB (25.0 ng/l), considered environmentally relevant, the authors found a removal of 66% after 96 h, reaching values below the OTC, but not significantly different from that observed at the mg/l level. However, the effects of different concentrations of MIB and geosmin on the degradation potential of each isolate in this study could not be evaluated, since only a single concentration of each compound was assessed.

The bacteria designated isolates 1, 5, and 9 showed the ability to remove more than 80% of MIB, and the other isolates removed about 50 to 77% of this compound. For geosmin, five isolates (1, 5, 9, 11, and 12) were able to remove over 80% within 48 h. The other isolates removed 63 to 79% of geosmin. The bacteria with the greatest ability to remove MIB and geosmin were isolated from Experiment I, in a water sample with low concentrations of MIB and geosmin (isolates 1 and 5); and from Experiment II, water with a high concentration of MIB, isolates 9, 11, and 12.

Egashira et al. (1992) reported that the MIB reduction ratio varied from 16.7 to 49.5% of the initial concentration (20.0 µg/l), in a reaction time of 24 h and incubated at 25°C. These results showed a maximum potential degradation lower than those found in the present study. However, because the experimental conditions and the time frame were very different from those used in our study, it is difficult to make meaningful comparisons. This indicates the importance of conducting studies with a wide range of concentrations of the tested compounds, as well as of assessing different parameters experimentally.

Several environmental factors that could influence the potential for degradation of MIB and geosmin, of the bacteria isolated from Guaíba Lake, were not evaluated in this study. Since the degradation ability was investigated for individual bacteria in MM containing the compounds in a synthetic form, we can presume that these organisms were not influenced by any interaction with the indigenous microbial community, for example, eliminating any nutrient competition (Gottschal, 1993 *apud* Hoefel et al. 2009). Some factors that could influence the degradation potential include signaling by other active microbial species, where such cell-to-cell communication can often have effects upon the regulation of genes such as those encoding degradative enzymes (Dunny et al. 2008).

The removal percentages of both MIB and geosmin were very similar, with less than a 10% difference between them, comparing all the bacteria isolates. Isolates 6, 10, and 12 showed differences of 10, 17, and 21%, respectively, in the removal potential, and these three bacteria degraded more geosmin than MIB. This showed that bacteria present in natural waters with high and low concentrations of MIB and geosmin, respectively, as in Guaíba Lake, may have similar consumption capabilities for these compounds, and have the potential for use in treatment processes.

The 13 bacteria isolates showed some preference in the consumption of geosmin, whereas the concentration remaining was slightly higher for the MIB compound than for geosmin. Geosmin appeared to be slightly easier to degrade than MIB, although the difference may be attributable to the higher volatility of geosmin (Ho et al. 2007). This compound has also been found to be adsorbed more easily by activated carbon (Newcombe and Cook 2002) and more readily oxidized by ozone (Ho et al. 2002). However, Saito et al. (1999) reported that geosmin was extremely difficult to degrade microbiologically under culture conditions in which it was used as the sole source of carbon. However, remarkably, the reaction was accelerated by adding ethanol, based on the concept of cometabolism.

The diversity of microorganisms and experimental conditions can prevent the comparability of data about the potential degradation of MIB and geosmin compounds. Thus, it is recommended that more detailed tests on biodegradability of compounds that cause taste and odor in water should be carried out. Additionally, the precise identification of bacterial isolates is needed.

The high concentrations of MIB and the presence of geosmin favored the development of a bacteria community able to degrade metabolites that cause taste and odor in the water of Guaíba Lake. This capability could be demonstrated, with the degradation of over 80% of the compounds. In this study, the success of the isolation was confirmed by the culturing of 13 bacteria, which used MIB and geosmin as the sole source of carbon for growth. These bacteria, present in natural waters, may have an important role in the cycling of MIB and geosmin compounds, during seasonal events of cyanobacteria blooms.

The MIB and geosmin biodegradation that occurred in the cultures indicates a widespread presence of MIB and geosmin degraders in the water sources in which these compounds are produced. Thus, the potential exists for in situ degradation of MIB and geosmin by indigenous bacteria in these waters. How this process might be enhanced is a practical question that is still to be answered.

Conclusions

This study advances knowledge of the types of bacteria capable of degrading MIB and geosmin compounds, since it is the first report concerning the isolation and characterization of Gram-positive and negative bacteria capable of degrading these metabolites individually in a planktonic state. The removal of MIB and geosmin by bacteria isolated from natural waters indicated a good potential for biodegradation, which can be used in biological filtration for the removal of taste- and odor-causing compounds in water-treatment plants.

Acknowledgments – This research was supported by Research and Projects Financing (FINEP) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410

Bendati MM, Maizonave CRM, Facchin JMJ, Thewes MR, Adaime HS (2005) Ocorrência de floração de cianobactéria *Planktothrix mougeotii* no Lago Guaíba em 2004: Atuação do DMAE no abastecimento público. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005, Campo Grande, MS. 412-413

- Carmichael WW (1997) *The cyanotoxins*. Adv. Botanical Res 27:211-256
- Dunny GM, Brickman TJ, Dworkin M (2008) Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. Bioessays 30:296-298
- Egashira K, Ito K, Yoshiy Y (1992) Removal of musty odor compounds in drinking water by biological filter. Water Science and Technology 25:307-314
- Elhadi SLN, Huck PM, Slawson RM (2004) Removal of geosmin and 2-methylisoborneol by biological filtration. Water Science and Technology 49:273-280
- Falconer IR (2005) *Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Ferreira Filho SS (1996) Otimização da aplicação do carvão ativado em pó no tratamento de água visando a redução de compostos orgânicos causadores de odor e sabor em águas de abastecimento. Engenharia Sanitária e Ambiental 1:131-143
- Ho L, Newcombe G, Croué J-P (2002) Influence of NOM on the ozonation of MIB and geosmina. Water Research 36:511-518
- Ho L, Hoefel D, Book F, Saint CP, Newcombe G (2007) Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmina through sand filters and in bioreactors. Chemosphere 66:2210-2218
- Hoefel D, Ho L, Aunkofer W, Monis PT, Keegan A, Newcombe G, Saint CP (2006) Cooperative biodegradation of geosmin by a consortium comprising three gram-negative bacteria isolated from the biofilm of a sand filter column. Letters in Applied Microbiology 43:417-423
- Hoefel D, Ho L, Monis PT, Newcombe G, Saint CP (2009) Biodegradation of geosmin by a novel Gram-negative bacterium; isolation, phylogenetic characterization and degradation rate determination. Water Research 43:2927-2935
- Ishida H, Miyaji Y (1992) Biodegradation of 2-methylisoborneol by oligotrophic bacteria isolated from an eutrophic lake. Water Science and Technology 25:269-276
- Izaguirre G, Wolfe RL, Means EG (1988) Bacterial degradation of 2-methylisoborneol. Water Science and Technology 20:205-210
- Izaguirre G, Wolfe RL, Means EG (1988) Degradation of 2-Methylisoborneol by Aquatic Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 54:2424-2431
- Izaguirre G, Taylor WD (2007) Geosmin and MIB events in a new reservoir in southern California. Water Science and Technology 55:9-14
- Joe WH, Choi IC, Baek YA, Choi YJ, Park GS, Yu MJ (2007) Advanced treatment for taste and odour control in drinking water: case study of a pilot scale plant in Seoul, Korea. Water Science and Technology 55:111-116

Lalezary S, Pirbazari M, McGuire MJ (1986) Evaluating activated carbons for removing low concentrations of taste and odour producing organics. *Journal of the American Water Works Association* 78:76-82

Lauderdale CV, Aldrich HC, Lindner AS (2004) Isolation and characterization of a bacterium capable of removing taste and odor causing 2- methylisoborneol from water. *Water Research* 38:4135-4142

Li L, Wan N, Gan NQ, Xia BD, Song LR (2007) Annual dynamics and origins of the odours compounds in the pilot experimental area of Lake Dianchi, China. *Water Science and Technology* 55:43-50

MacDowall B, Hoefel D, Newcombe G, Saint CP, Ho L (2009) Enhancing the biofiltration of geosmin by seeding sand filter columns with a consortium of geosmin-degrading bacteria. *Water Research* 43:433-440

Narayan LV, Nunez WJ (1974) Biological control and bacterial oxidation of the taste and odor compound geosmin. *Journal of the American Water Works Association* 66: 32-536

Nerenberg R, Rittmann BE, Soucie WJ (2000) Ozone/biofiltration for removing MIB and geosmin. *Journal of the American Water Works Association* 92:85-95

Newcombe G, Cook D (2002) Influences on the removal of tastes and odours by PAC. *J. Water Supply Res Technol* 51:463-474

Rittmann BE, Gantzer CJ, Montiel A (1995) Biological treatment to control taste-and-odor compounds in drinking water treatment. In: Suffet, I.H., Mallevalle, J. Kawczynski, E. (Eds.), *Advances in Taste-and-Odor Treatment and Control*. American Water Works Association Research Foundation, Denver, USA, 209-246

Saadoun I, El-Migdadi F (1998) Degradation of geosmin-like compounds by selected species of Gram-positive bacteria. *Lett Appl Microbiol* 26:98-100

Saito A, Tokuyama T, Tanaka A, Oritani T, Fuchigami K (1999) Microbiological degradation of (-)-geosmin. *Water Research* 33:3033-3036

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York

Silvey JKG, Henley AW, Nunez WJ, Cohen RC (1970) Biological control: control of naturally occurring taste and odors by microorganisms. In: *Proceedings of the National Biological Congress*, Detroit, USA

Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33:152-155

Suffet IH, Corado A, Chou D, Maguire M, Butterworth S (1996) AWWA taste and odor survey. *Journal of the American Water Works Association* 88:166-180

Sugiura N, Hiroko I, Maekawa T (2003) Degradation potential of musty odour in a drinking water source by a biofilm method. *Journal of Water Supply: Research and Technology* 52:181-187

Sugiura N, Utsumi M, Wei B, Iwami N, Okano K, Kawauchi Y, Takaaki M (2004) Assessment for the complicated occurrence of nuisance odours from phytoplankton and environmental factors in a eutrophic lake. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 9:195-201

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599 (Publication PDF at <http://www.kumarylabs.net/publications>)

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882

Tung Shu-Chu, Lin Tsair-Fuh, Yang Feng-Cheng, Liu Chia-Lin (2008) Seasonal change and correlation with environmental parameters for 2-MIB in Feng-Shen Reservoir, Taiwan. *Environ Monit Assess* 145:407-416

Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommung der Quantitative Phytoplankton-Metodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie, Stuttgart* 9:1-38

Uwins HK, Teasdale P, Stratton H (2007) A case study investigating the occurrence of geosmin and 2-methylisoborneol (MIB) in the surface waters of the Hine Dam, Gold Coast, Australia. *Water Science and Technology* 55:231-238

Westerhoff P, Rodriguez-Hernandez M, Sommerfeld M (2005) Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs. *Water Research* 39:4899-4912

Yen H, Lin T, Tseng I, Tung S, Hsu M (2007) Correlation 2-MIB and microcystin concentrations with environmental parameters in two reservoirs in south Taiwan. *Water Science and Technology* 55:33-41

Yu-Hsiang S, Tzu-Ying L, Shang-Da H (2005) Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta* 65:518-524

Zimba PV, Dionigi CP, Millie DF (1999) Evaluating the relationship between photopigment synthesis and 2-methylisoborneol accumulation in cyanobacteria. *J Phycol* 35:1422-1429

Capítulo V

Discussão Geral



5. DISCUSSÃO GERAL

5.1 Remoção de MIB e geosmina por adsorção em CAG

Para demonstrar o potencial de utilização de CAGs em processos de filtração biológica, verificou-se a capacidade destes, na remoção de MIB e geosmina da água. Uma vez que os carvões ativados de diferentes materiais e procedências apresentaram capacidade de remoção distinta desses compostos, ficou evidente a necessidade de avaliações constantes do poder de adsorção dos carvões, através de ensaios de laboratório, pelas companhias de abastecimento. Esse procedimento, antes da aplicação no tratamento, seja na forma de CAP ou filtros de CAG, poderia melhorar a eficiência do processo. Isso foi comprovado pelos resultados dos testes de tempo de equilíbrio de adsorção e isothermas de Freundlich, apresentados no Capítulo I do presente estudo.

Dentre os carvões testados, os de origem vegetal, madeira e casca de coco, foram os que apresentaram os melhores desempenhos na remoção de MIB e geosmina, respectivamente. Esses dois carvões removeram os compostos abaixo do LDO (10 ng/l) com doses de 50 mg/l e tempo de contato de duas horas, embora esses valores sejam subestimados. Isto porque, os experimentos foram conduzidos com água destilada, livre de competidores pelos sítios de adsorção dos carvões. Optou-se por essa metodologia a fim de garantir a comparabilidade dos dados.

A capacidade adsortiva dos CAGs foi melhor avaliada pela Isotherma de Freundlich do que pelas características de cada carvão. Uma vez que a análise de um único parâmetro não foi eficiente na escolha do melhor CA na remoção dos compostos causadores de gosto e odor. Este fato foi comprovado pela não coincidência dos resultados de melhor capacidade adsortiva utilizando os quatro diferentes parâmetros para os carvões testados: número de iodo, área superficial BET, porcentagem de volume de microporos e constante K (obtida com as curvas isotérmicas). Esses resultados também foram comprovados por Newcombe *et al.* (1994) e Chen *et al.* (1997).

5.2 Isolamento e caracterização de bactérias capazes de degradar MIB e geosmina

Os diferentes locais e períodos de coleta no Lago Guaíba, denominados de Experimento I e II, para a obtenção dos inóculos de bactérias permitiu o registro de baixa (21 ng/l) e alta (1033 ng/l) concentrações de MIB, sendo esta última durante um evento de floração de cianobactérias, onde houve liberação de forte cheiro de terra no ambiente. O composto geosmina somente foi detectado em baixas concentrações (3 e 6 ng/l).

Uma vez que foram isoladas e caracterizadas bactérias capazes de degradar ambos os compostos, ficou comprovada a existência de uma comunidade bacteriana presente naturalmente no ambiente, que é capaz de aproveitar o surgimento de MIB e geosmina, utilizando-os como fonte de carbono no seu metabolismo. Este resultado foi corroborado no trabalho de Lauderdale *et al.* (2004), o qual relacionou os microrganismos presentes no ambiente com a ciclagem dos metabólitos durante eventos sazonais de florações de cianobactérias.

Pouco é conhecido a respeito da comunidade microbiana associada às cianobactérias (Berg *et al.*, 2009). Os estudos sobre as florações têm se concentrado na composição de espécies e fatores físico-químicos que influenciam seu desenvolvimento. Entretanto, várias bactérias associadas podem exercer um importante impacto no crescimento das cianobactérias e causar efeitos adversos à saúde dos homens e animais (Sigee, 2005). Esses microrganismos podem também modificar os efeitos ambientais das florações, tais como, a degradação do material orgânico, o qual pode provocar a depleção do oxigênio dissolvido e conseqüentemente à morte de animais presentes nos corpos d'água (Havens, 2007).

O isolamento e a identificação de bactérias a partir do ambiente natural ou de filtros biológicos e a capacidade desses microrganismos degradarem MIB e geosmina, já foram registradas em outros trabalhos (Izaguirre *et al.*, 1999; Lauderdale *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2006). Entretanto, o único relato do potencial de degradação individual de geosmina por bactérias Gram negativas foi de Hoefel *et al.* (2009), não havendo relatos para o composto MIB. Os demais registros mostram o sucesso na degradação dos metabólitos das cianobactérias através de um consórcio de bactérias. Portanto, o presente estudo relata o primeiro registro de bactérias

Gram positivas e negativas capazes de degradar, individualmente, ambos os compostos MIB e geosmina na mesma solução teste e sem um substrato sólido.

Embora os sequenciamentos genéticos, de cerca de 400 pb dos isolados bacterianos, realizados no presente estudo, não tenham sido suficientes para identificá-los em nível de espécie, foram registrados seis gêneros: *Arthrobacter* sp, *Burkholderia* sp, *Caulobacter* sp, *Klebsiella* sp, *Leucobacter* sp e *Sphingomonas* sp. Além desses gêneros, um isolado foi classificado como Sphingomonadaceae e outros três como Enterobacteriaceae. Destes, somente *Arthrobacter* (Saadoun e El-Migdadi, 1998), *Sphingomonas* (Hoefel *et al.*, 2006, 2007) e Enterobacteriaceae (Tanaka *et al.*, 1996) já haviam sido registrados como capazes de degradar os metabólitos MIB ou geosmina. Os isolados F1 (*Bacillus* sp.) e F2 (bacilo Gram $\bar{}$) foram assim denominados através da coloração de Gram, no Capítulo III. Após o sequenciamento genético, esses isolados foram classificados como *Sphingomonas* sp.

Segundo Berg *et al.* (2009), a análise das amostras de água com floração de cianobactérias ou de plantas de tratamento, com frequente ocorrência desses microrganismos, revelou uma ampla diversidade bacteriana. Dentre estas, existe o potencial de descrição de novos táxons para a ciência, um grande número de cepas com capacidade de inibir ou favorecer o crescimento das cianobactérias e alguns patógenos oportunistas de humanos e animais. Além dessas, registraram-se bactérias capazes de degradar compostos orgânicos recalcitrantes, incluindo as cianotoxinas. Os gêneros observados no presente estudo *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Caulobacter* e *Sphingomonas* também foram registrados por Berg *et al.* (2009). Lemes *et al.* (2008) demonstraram a capacidade de biodegradação de cianotoxinas (microcistinas: MC-LR e [D-Leu¹]MC-LR) por uma comunidade bacteriana estuarina e costeira presente na região da Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. O gênero *Burkholderia* sp foi isolado a partir desses experimentos, sendo o primeiro relato da sua capacidade de crescer em meio enriquecido com MC-LR, como única fonte de carbono. Assim, este gênero presente em ambientes naturais apresenta um potencial de utilização em processos de filtração biológica para remoção dos metabólitos, MIB, geosmina e cianotoxinas.

A presença de bactérias potencialmente patogênicas associadas às florações de cianobactérias poderia explicar alguns sintomas adversos à saúde humana após

o contato com águas contendo ambos os microrganismos. Isto porque, os sintomas reportados após a exposição das pessoas, a essa água, assemelham-se àqueles causados por alguns patógenos oportunistas (Berg *et al.*, 2009). Deve-se dar maior atenção a este fato, quando se trata dos problemas associados às florações de cianobactérias, visto que somente são citados os riscos em relação à presença de cianotoxinas na água.

5.3 Biodegradação de MIB e geosmina

Uma vez que pouco se conhece a respeito da comunidade bacteriana, presente em águas naturais, com potencial para processos de tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos, causadores de gosto e odor, o presente trabalho, pode ser considerado pioneiro nessas pesquisas no Brasil. O potencial de degradação de 13 bactérias, isoladas do Lago Guaíba, variou de 50 a 86% a partir das concentrações iniciais de 981 e 978 ng/l de MIB e geosmina, respectivamente, ao longo de 48 horas de experimento. Em outra etapa do trabalho, o isolado 12 (*Sphingomonas* sp) apresentou potencial de degradação de 89 e 93% de MIB e geosmina, respectivamente. O isolado 13 (*Sphingomonas* sp) removeu cerca de 96% de ambos os compostos, ao longo de 120 horas. O sucesso no isolamento, manutenção de culturas puras, identificação e determinação da capacidade desses microrganismos degradarem MIB e geosmina da água sugere um potencial de utilização dessas bactérias em processos de filtração biológica.

Há mais de uma década, Saadoun e El-Migdadi (1998) mostraram que a geosmina pode ser degradada biologicamente. Assim, foi sugerido que a biodegradação deste composto, como de outras substâncias de ocorrência natural, pode ser aplicada como um método alternativo para a remoção de gosto e odor da água. Mesmo com o incentivo dessas descobertas, pouco se desenvolveu a respeito da aplicação efetiva dessa tecnologia no Brasil, para garantir uma água de melhor qualidade para os consumidores. Isso pode estar ocorrendo, provavelmente, devido a não exigência de concentrações máximas permitidas de MIB e geosmina, na água potável, pela portaria 518 do Ministério da Saúde, uma vez que esses compostos são considerados somente causadores de problemas estéticos no ambiente. Entretanto, Huang *et al.* (2007) demonstraram atividade mutagênica associada aos

extratos liberados por culturas de cianobactérias, contendo MIB e geosmina, entre outros compostos. Os trabalhos de Höckelmann *et al.* (2004) e Mochida (2009) consideraram muito baixa a toxicidade dos compostos MIB e geosmina aos seres humanos, porém com efeitos tóxicos sobre outras espécies. Portanto, enquanto não há consenso em relação aos impactos provocados à saúde, os odores e gostos causados por MIB e geosmina podem originar efeitos psicossomáticos, como dores de cabeça, estresse ou problemas estomacais (Young *et al.*, 1996), não devendo ser minimizados pelas autoridades responsáveis pela saúde pública (Benetti *et al.*, 2009). Outro aspecto fundamental, associado à falta de aplicação e utilização da biodegradação no tratamento de água, relaciona-se ao alto custo em adaptar as ETAs a estes processos.

No experimento de 48 horas, a concentração remanescente de geosmina foi menor do que a de MIB, para 12 bactérias. A bactéria F1 (*Sphingomonas* sp) reduziu a concentração de MIB de 1033 para 99 ng/l, e geosmina de 990,5 para 60,5 ng/l, indicando um maior consumo do último composto, ao longo de 120 horas. A maior massa celular dessa bactéria foi registrada em 24 horas, coincidindo com a queda de 70% na concentração de geosmina, não ocorrendo o mesmo com MIB. Estes resultados fornecem indícios de preferência de consumo do composto geosmina em relação à MIB, fato também observado por Ho *et al.* (2007). Entretanto, Saito *et al.* (1999) relataram maior dificuldade de biodegradação de geosmina, quando esta foi usada como a única fonte de carbono. Essa variação de resultados indica a necessidade de estudos sob condições experimentais semelhantes, a fim de obter maior comparabilidade dos dados. No presente estudo, uma próxima etapa poderia contemplar a capacidade de degradação de MIB e geosmina, separadamente nas soluções testes.

As concentrações dos compostos causadores de gosto e odor não foram reduzidas abaixo do LDO, isto é, 10 ng/l, mesmo com potenciais de degradação de 96%, ao longo de 120 horas de experimento. Isto pode ter ocorrido pela ausência de interação com a comunidade bacteriana do ambiente, impedindo, por exemplo, a influência de sinais extracelulares de outras bactérias ativas. Essa falta de interação entre os microrganismos pode alterar a regulação dos genes, envolvidos na produção de enzimas (Dunny *et al.*, 2008). Fatores que podem influenciar o potencial de degradação das bactérias em ambientes naturais incluem mudanças sazonais no aporte de carbono orgânico dissolvido (Judd *et al.*, 2006), efeitos letais

da radiação ultravioleta (Häder e Sinha, 2005) e a predação da comunidade bacteriana por organismos heterotróficos (Jürgens e Mantz, 2002). Uma vez que o presente estudo mostrou a capacidade das bactérias utilizarem MIB e geosmina como única fonte de carbono, uma próxima etapa deveria verificar a preferência das bactérias por outros substratos, bem como a interação entre os isolados bacterianos.

O potencial de degradação dos compostos causadores de gosto e odor pelas bactérias pode variar em função do estado planctônico, quando comparado à integração em um biofilme. Ho *et al.* (2007) relataram que a biodegradação de MIB e geosmina na ausência de um substrato sólido teve taxas constantes três vezes maiores do que aquelas obtidas em experimentos com filtros de areia. No estado planctônico, as bactérias têm maior mobilidade dentro da cultura líquida, isto é, um contato maior com as moléculas dos compostos, em comparação com as bactérias de um biofilme aderido ao filtro de areia (Rittmann *et al.*, 1995). Entretanto, o tratamento de água através de biofilmes é, normalmente, uma alternativa mais eficiente do que a planctônica, uma vez que as células do biofilme podem mais facilmente se adaptar a mudanças e estão mais protegidas dentro da matriz (Decho, 2000). É bem documentado que a integração dos microrganismos em uma matriz de biofilme é um processo complexo e multifatorial, frequentemente resultando em alterações fenotípicas dos organismos associados (Singh *et al.*, 2006). De fato, já foram demonstrados diferentes padrões de expressão gênica, de determinadas populações de bactérias associadas a biofilmes, quando comparadas ao seu estado planctônico (Whiteley *et al.*, 2001).

O conhecimento do processo de oxidação biológica dos compostos MIB e geosmina é de fundamental importância no que diz respeito à remoção de carbono orgânico da água, pelas estações de tratamento. Isso poderia diminuir a formação de biofilmes nos sistemas de distribuição, reduzindo essas fontes de gosto e odor na água tratada. Os ensaios de laboratório e em plantas piloto, aproveitando os episódios sazonais de gosto e odor na água potável, são fundamentais para simular situações reais, auxiliando na escolha do método mais eficiente na remoção de MIB e geosmina da água. Esta decisão pode variar ao longo do ano, em função da severidade dos episódios de gosto e odor.

As principais contribuições do presente estudo foram o conhecimento da capacidade de adsorção de MIB e geosmina por CAGs, de diferentes materiais e

procedências, e a comprovação da biodegradação desses compostos, por bactérias aquáticas isoladas do Lago Guaíba. Esses resultados são fundamentais para o desenvolvimento de processos alternativos de tratamento de água, como a filtração biológica. Assim, os CAGs poderiam servir como meio suporte para a formação do biofilme, bem como adsorver compostos orgânicos, entre eles, os causadores de gosto e odor na água. Os processos que utilizam filtros biológicos, usados como um polimento nos sistemas de tratamento podem viabilizar uma remediação mais eficiente dos problemas de gosto e odor em águas contaminadas com metabólitos produzidos por cianobactérias, garantindo uma água de melhor qualidade para a população.

Capítulo VI

Conclusões



6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusões

- Os CAGs de origem vegetal apresentaram os melhores desempenhos na remoção dos compostos causadores de gosto e odor na água quando comparados ao carvão de origem animal, uma vez que reduziram as concentrações de MIB e geosmina abaixo do LDO.
- A capacidade adsortiva dos CAGs foi melhor avaliada pela Isoterma de Freundlich do que pelas características de cada carvão. A análise de um único parâmetro como número de iodo, área superficial BET e porcentagem de microporos não foi eficiente na escolha do melhor CA na remoção dos compostos MIB e geosmina.
- A constante K , obtida com as curvas isotérmicas, mostrou-se o parâmetro mais adequado para expressar a capacidade adsortiva dos três carvões testados.
- A maior remoção de MIB e geosmina foi associada com o aumento da dosagem de CAG, demonstrando a importância de realizar ensaios experimentais específicos, antes da utilização do CA pelas ETAs.
- As bactérias isoladas do ambiente foram capazes degradar MIB e geosmina, utilizando-os como fonte de carbono no seu metabolismo.
- Quatro novos gêneros de bactérias capazes de degradar MIB e geosmina foram registrados: *Burkholderia* sp, *Caulobacter* sp, *Klebsiella* sp e *Leucobacter* sp. Além desses, foram registrados *Arthrobacter* sp, *Sphingomonas* sp, Enterobacteriaceae e Sphingomonadaceae.
- O sucesso no isolamento, manutenção de culturas puras, identificação e determinação da capacidade desses microrganismos degradarem MIB e geosmina da água sugere um potencial de utilização dessas bactérias em processos de filtração biológica.

6.2 Recomendações

De acordo com os dados aqui obtidos, somados aos da literatura, é importante considerar os esforços em preservar os mananciais, reduzindo os fatores que favorecem o desenvolvimento de florações de cianobactéria e, conseqüentemente, os episódios de gosto e odor na água. Esses fatores estão relacionados, principalmente, ao tratamento dos efluentes líquidos das cidades, para reduzir as concentrações de nitrogênio e fósforo, antes da liberação nos mananciais de abastecimento, evitando a eutrofização artificial da água.

Como sugestão de trabalhos futuros, seria importante avaliar o processo de filtração biológica, em experimentos de bancada e piloto. Para isso, o CAG de melhor capacidade adsortiva seria utilizado juntamente com as bactérias capazes de degradar MIB e geosmina. No desenvolvimento do biofilme será necessário investigar o potencial de degradação de um consórcio de bactérias, parâmetros que favorecem ou inibem seu desenvolvimento, bem como a interferência da matéria orgânica natural e outras substâncias no processo de biodegradação e adsorção.

Capítulo VII

Referências Bibliográficas



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *EB 2133*: carvão ativado pulverizado – especificações. Rio de Janeiro, 1991a.

_____. *MB 3410*: carvão ativado pulverizado – determinação do Número de Iodo. Método de ensaio. Rio de Janeiro, 1991b.

_____. *MB 3412*: carvão ativado pulverizado – determinação granulométrica. Método de ensaio. Rio de Janeiro, 1991c.

AHN, H., CHAE, S., KIM, W.C., SUMMERS, R.S. Efficient taste and odour removal by water treatment plants around the Han River water supply system. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 5, p. 103-109, 2007.

ASHITANI, K., HISHIDA, Y., FUJIWARA, K. Behavior of musty odorous compounds during the process of water treatment. *Water Science and Technology*, v. 20, n. (8/9), p. 261-267, 1988.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard practice for determination of adsorptive capacity of activated carbon by aqueous phase isotherm technique – D3860-98. In: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standards on activated carbon*. Philadelphia, 2000. p. 47-49.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.

BAFFORD, R.A., SEAGULL, R.W., CHUNG, S.Y., MILLIE, D.F. Intracellular-localization of the taste odor metabolite 2- methylisoborneol in *oscillatoria-limosa* (Cyanophyta). *Journal of Phycology*, v. 29, n. 1, p. 91–95, 1993.

BAKER, P.D., CUNLIFFE, D.A., GRAHAM, D.K. *Biological Sources of Taste and Odour in the Millbrook-Mannum Water Supply System*. Austrália Centre for Water Treatment and Water Quality Research, Salisbury, South Austrália, 1994.

BENDATI, M.M., MAIZONAVE, C.R.M., FACCHIN, J.M.J., THEWES, M.R., ADAIME, H.S. Ocorrência de floração de cianobactéria *Planktothrix mougeotii* no Lago Guaíba em 2004: Atuação do DMAE no abastecimento público. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005, Campo Grande,. *Anais...* Campo Grande, p. 412-413, 2005.

BENETTI, A.D.; DE LUCA, S.J. ; CYBIS, L.F. *Remoção de gosto e odor em processos de tratamento de água*. In: Valter Lucio de Pádua. (Org.). *Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, p. 292-326, 2009.

BERG, K.A., LYRA, C., SIVONEN, K., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S., TUOMI, P., RAPALA, J. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The ISME Journal*, v.3, p. 34-325, 2009.

BLACKWOOD, K.S., TURENNE, C.Y., HARMSSEN, D., KABANI, A.M. Reassessment of Sequence-Based Targets for Identification of *Bacillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 4, p. 1626-1630, 2004.

BLÁHA, L., SABATER, S., BABICA, P., VILASTA, E., MARSALEK, B. *Water Science and Technology*, v. 49, n. 9, p. 307-312, 2004.

BRANCO, S.M. *Hidrobiologia aplicada à Engenharia Sanitária*. 2ª ed. São Paulo: CETESB; 1978.

BRANDÃO, C.C.S., SILVA, A.S. *Remoção de Cianotoxinas por Adsorção em Carvão Ativado*. In: Pádua, V.L. (Coord.). *Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, 2006, cap. 10, p. 415-465, 2006.

BRASIL, C.P., BRANDÃO, C.C.S. *Avaliação da remoção de microcistina em água de abastecimento público por diferentes carvões ativados em pó produzidos no Brasil*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23, 2005, Campo Grande. [*Anais Eletrônicos I-114*], Campo Grande: ABES, 2005. CD-ROM.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria nº 518*. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 26 mar. 2004.

BRUNAUER, S., EMMETT, P.H., TELLER, E. *Journal of American Chemical Society*, v. 60, 309, 1938.

BURR, M.D., CLARK, S.J., SPEAR, C.R. CAMPER, A.K. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microbial Ecology*, v. 51, p. 479-486, 2006.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W. The cyanotoxins. *Advanced Botanical Research*, v. 27, p. 211-256, 1997.

CARMICHAEL, W.W., FALCONER, I.R. *Diseases related to freshwater algal toxins, control measures*. In: *Algal toxins in seafood and drinking water* (I. Falconer, ed.). Academic Press, Londres, p. 187-209, 1993.

CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J-S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RHINEHARD, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacterial chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 7663–668, 2001.

CHARACKLIS, W., MARSHALL, K. *Biofilms*. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 1990.

CHAVES, P.F., ROCHA, S.B., DUTRA, A.T.M., YUNES, J.S. Ocorrência de cianobactérias produtoras de toxinas no Rio dos Sinos (RS) entre os anos de 2005 e 2008. *Oecologia Brasiliensis*, v. 13, n. 2, p. 319-328, 2009.

CHEN, G., DUSSERT, B.W., SUFFET, I.H. Evaluation of granular activated carbons for removal of methylisoborneol to below odor threshold concentration in drinking water. *Water Research*, v. 31, n. 5, p. 1155-1163, 1997.

CHESTER, B., CLEARY, T. Evaluation of the Minitex System for identification of nonfermentative and nonenteric fermentative gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 12, p. 509-516, 1980.

CHORUS, I., BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, Inc. New York, 416p, 1999.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, v. 16, p.51-60, 2000.

COELHO, E.R.C., VAZZOLER, H. *Capacidade de adsorção frente as isoterms de Langmuir e Freudlich para atrazina em materiais zeolíticos e carbonosos utilizados em tratamento de água na remoção de matéria orgânica natural e sintética*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23, 2005, Campo Grande. *Anais Eletrônicos I-050*, Campo Grande, 2005.

COOK, D., NEWCOMBE, G., SZTAJNBOK, P. The application of powdered activated carbon for MIB and geosmina removal: predicting PAC doses in four raw water. *Water Research*, v. 35, n. 5, p. 1325-1333, 2001.

COUTINHO, A.R., BARBIERI, F.C., PAVANI, P.A. *Preparação de carvões ativados a partir de fibras de cellulose*. In: 2º Encontro brasileiro de adsorção, maio de 1998, Florianópolis, Santa Catarina. Anais de trabalhos apresentados, Leonel T. Pinto (editor), p. 139-144, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil, 2000.

CYBIS, L.F. *et al. Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: caso represa Lomba do Sabão e lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul*. Rio de Janeiro: ABES. 64p., il, 2006.

DECHO, A.W. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, v. 20, p. 1257-1273.

DI BERNARDO, L. *Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento*. Rio de Janeiro: ABES, 1995. 140p.

DI BERNARDO, L., DANTAS, A.D.B. *Métodos e técnicas de tratamento de água*. 2 ed. São Carlos: Rima, 2005. 1565 p.

DMAE - Departamento Municipal de Águas e Esgotos. Avaliação da qualidade da água do Lago do Guaíba: Subsídios para a gestão da bacia hidrográfica, *Ecospesquisa*, 7, Porto Alegre, DMAE, 06/2003.

DMAE - Departamento Municipal de Águas e Esgotos. Porto Alegre Inova no Tratamento de Água, *Ecospesquisa*, 26 (14), Porto Alegre, DMAE, 08/2007.

DONATI, C. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Water Research*, v. 28, n. 8, p. 1735-1742, 1994.

EGASHIRA, K., ITO, K., YOSHIY, Y. Removal of musty odor compounds in drinking water by biological filter. *Water Science and Technology*, v. 25, p. 307-314, 1992.

DUNNY, G.M., BRICKMAN, T.J., DWORKIN, M. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays*, v. 30, pp. 296-298, 2008.

EATON, R., SANDUSKY, P. Biotransformation of 2-methylisoborneol by camphor-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 583-588, 2009.

EATON, R., SANDUSKY, P. Biotransformations of (+/-)-geosmin by terpene-degrading bacteria. *Biodegradation*, v. 21, p. 71-79, 2010.

EGASHIRA, K., ITO, K., YOSHIY, Y. Removal of musty odor compounds in drinking water by biological filter. *Water Science and Technology*, v. 25, p. 307-314, 1992.

EISERT, R., LEVSEN, K. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for analysis of organics in water. *Journal of Chromatography*, v. 733, p. 143-157, 1996.

ELHADI, S.L.N., HUCK, P.M., SLAWSON, R.M. Removal of geosmin and 2-methylisoborneol by biological filtration. *Water Science and Technology*, v. 49, n. 9, p. 273-280, 2004.

FALCONER, I.R. *Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: Cylindrospermopsins and Microcystis*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.

FALCONER I.R, BARTRAM, J., CHORUS, I., KUIPER-GOODMAN, T., UTKILEN H., BURCH, M., COOD, G.A. *Safe levels and safe practices*. In: CHORUS I., BARTRAM J. (Ed.). *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health – consequences, monitoring and management*. London: E&FN Spon; 1999. cap. 5, p. 155-178.

FERREIRA FILHO, S.S. Otimização da aplicação do carvão ativado em pó no tratamento de água visando a redução de compostos orgânicos causadores de odor e sabor em águas de abastecimento, *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 1, n. 4, p. 131-143, 1996.

FREITAS, A.M., SIRTORI, C., PERALTA-ZAMORA, P.G. Avaliação do potencial de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas com geosmina e 2-MIB. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 75-78, 2008.

FREUNDLICH, H. *Colloid and Capillary Chemistry*. E.P. Dutton and Co., New York.

FUNASA. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano. Impactos na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano*. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2003. 56 p.

GILLOGLY, T.E.T, SNOEYINK, V.L., NEWCOMBE, G., ELARDE, J.R. A simplified method to determine the powdered activated carbon dose required to remove methylisoborneol. *Water Science and Technology*, v. 40, n. 6, p. 59-64, 1999.

GLÖCKNER, F.O., ZAICHIKOV, E., BELKOVA, N., DENISSOVA, L., PERNTHALER, J., PERNTHALER, A., AMANN, R. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 11, p. 5053-5065, 2000.

GONZÁLEZ, J.M., SIMÓ, R., MASSANA, R., COVERT, J.S., CASAMAYOR, E.O., PEDRÓS-ALIÓ, C., MORAN, M.A. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4237–4246, 2000.

GRAESE, S.L., SNOEYINK V.L., LEE R.G. *GAC Filter-Adsorbers*. AWWA Research Foundation, Denver, Colorado, p. 39-59, 1987.

GRAHAM, M., SUMMERS, R., SIMPSON, M., MACLEOD, B. Modelling equilibrium adsorption of 2-methylisoborneol and geosmina in natural water. *Water Research*, v. 34, n. 8, p. 2291-2300, 2000.

HÄDER, D.P., SINHA, R.P. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research*, v. 571, p. 221–233, 2005.

HAVENS, K.E. *Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems*. In: Hudnell, K.H. (ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research*, v. 69, p. 675-732, 2007.

HEPPLEWHITE, C., NEWCOMBE, G., KNAPPE, D.R.U. NOM and MIB, who wins in the competition for activated carbon adsorption sites? *Water Science and Technology*, v. 49, n. 9, p. 257-265, 2004.

HO, L., HOEFEL, D., AUNKOFER, W., MEYN, T., KEEGAN, A., BROOKERS, J., SAINT, C., NEWCOMBE, G. Biological filtration for the removal of algal metabolites from drinking water. *Water Science and Technology*, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2006.

HO, L., HOEFEL, D., BOCK, F., SAINT, C.P., NEWCOMBE, G. Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmina through sand filters and in bioreactors. *Chemosphere*, v. 66, n. 11, p. 2210-2218, 2007.

HO, L., NEWCOMBE, G., CROUÉ, J-P. Influence of NOM on the ozonation of MIB and geosmina. *Water Research*, v. 36, p. 511-518, 2002.

HÖCKELMANN, C., MOENS, T., JÜTTNER, F. Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. *Limnology and Oceanography*, v. 49, p. 1809–1819, 2004.

HOEFEL, D., MONIS, P.T., GROOBY, W.L., ANDREWS, S., SAINT, C.P. Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p. 175–186, 2005.

HOEFEL, D., HO, L., AUNKOFER, W., MONIS, P.T., KEEGAN, A., NEWCOMBE, G., SAINT, C.P. Cooperative biodegradation of geosmin by a consortium comprising three gram-negative bacteria isolated from the biofilm of a sand filter column. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 417–423, 2006.

HOEFEL, D., HO, L., MONIS, P.T., NEWCOMBE, G., SAINT, C.P. Biodegradation of geosmin by a novel Gram-negative bacterium; isolation, phylogenetic characterization and degradation rate determination. *Water Research*, v. 43, p. 2927-2935, 2009.

HOSAKA, M. MURATA, K., IIKURA, Y., OSHIMI, A., UDAGAWA, T. Off-flavor problem in drinking water of Tokyo arising from the occurrence of musty odor in downstream tributary. *Water Science and Technology*, v. 31, p. 29-34, 1995.

HUANG, C., BENSCHOTEN, J. E. V., JENSEN, J. N. Adsorption kinetics of MIB and geosmin. *Journal American Water Works Association*, v. 88, n. 4, p. 116-128, 1996.

HUANG, W.J., LAI, C.H., CHENG, Y.L. Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Science of the Total Environment*, v. 377, n. 2/3, p. 214-223, 2007.

HUSZAR, V.L., SILVA, L.H.S., MARINHO, M., DOMINGOS, P., SANT'ANNA, C.L. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian Waters. *Hydrobiology*, v. 424, p. 67-77, 2000.

ISHIDA, H.; MIYAJI, Y. Biodegradation of 2 methylisoborneol by oligotrophic bacterium isolated grow eutrophic lake. *Water Science and Technology*, v. 25, n. 2, p. 269-276, 1992.

IZAGUIRRE, G., HUANG, C.J., KRASNER, S.W., MCGUIRE, M.J. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, p. 708-714, 1982.

IZAGUIRRE, G., WOLFE, R.L., MEANS, E.G. Bacterial degradation of 2-methylisoborneol. *Water Science and Technology*, v. 20, n. 8/9, p. 205-210, 1988 a.

IZAGUIRRE, G., WOLFE, R.L., MEANS, E.G. Degradation of 2-Methylisoborneol by Aquatic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 10, p. 2424-2431, 1988b.

IZAGUIRRE, G., TAYLOR, W.D., PASEK, J. Off-flavor problems in two reservoirs, associated with planktonic *Pseudanabaena* species. *Water Science and Technology*, v. 40, n. 6, p. 85-90, 1999.

IZAGUIRRE, G., TAYLOR, W.D. Geosmin and MIB events in a new reservoir in southern California. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 5, p. 9-14, 2007.

JOE, W.H., CHOI, I.C., BAEK, Y.A., CHOI, Y.J., PARK, G.S, YU, M.J. Advanced treatment for taste and odour control in drinking water: case study of a pilot scale plant in Seoul, Korea. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 5, p. 111-116, 2007.

JUDD, K.E., CRUMP, B.C., KLING, G.W. Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition. *Ecology*, v. 87, p. 2068–2079, 2006.

JÜRGENS, K., MATZ, C. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 81, p. 413–434, 2002.

JUTTNER, F. Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae. *Water Science and Technology*, v. 31, p. 69-78, 1995.

KIM, Y., LEE, Y., GEE, C.S., CHOI, E. Treatment of taste and odor causing substances in drinking water. *Water Science and Technology*, v. 35, n. 8, p. 29-36, 1997.

KISAND, V., TAMMERT, H. Bacterioplankton strategies for leucine and glucose uptake after a cyanobacterial bloom in an eutrophic shallow lake. *Soil Biology & Biochemistry*, v.32, p.1965-1972, 2000.

KURODA, E.K., JÚNIOR, E.C.A., DI BERNARDO, L., TROFINO, J.C. *Caracterização e escolha do tipo de carvão ativado a ser empregado no tratamento de água contendo microcistinas*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23, 2005, Campo Grande. [Anais Eletrônicos I-072], Campo Grande.

LALEZARY, S., PIRBAZARI, M., MCGUIRE, M.J. Evaluating activated carbons for removing low concentrations of taste and odour producing organics. *Journal American Water Works Association*, v. 78, p. 76-82, 1986.

LANÇAS, F. *Métodos cromatográficos de análise: extração em fase sólida (SPE)*. v. 4. São Carlos: Rima Editora, 2004, p.93.

LAPALME, R., BORSCHBERG, H-B., SOUCY, P., DESLONGCHAMPS, P. Thermal decomposition of ozonides. A complementary method to the Bayer-Villiger oxidation of hindered ketones. *Canadian Journal Chemical*, v. 57, p. 305-312, 1979.

LAUDERDALE, C.V., ALDRICH, H.C., LINDNER, A.S. Isolation and characterization of a bacterium capable of removing taste and odor causing 2- methylisoborneol from water. *Water Research*, v. 38, p. 4135-4142, 2004.

LEMES, G.A.F., KERSANACH, R., PINTO, L.S., DELLAGOSTIN, O.A., YUNES, J.S., MATTHIENSEN, A. Biodegradation of microcystin by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p. 358-365, 2008.

LI, L., WAN, N., GAN, N.Q., XIA, B.D., SONG, L.R. Annual dynamics and origins of the odours compounds in the pilot experimental area of Lake Dianchi, China. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 5, p. 43-50, 2007.

LIU, WEN-TSO, MARSH, T.L., CHENG, H., FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4516-4522, 1997.

LLYOD, S., LEA, J., ZIMBA, P., GRIMM, C. Rapid analysis of geosmin and 2-methylisoborneol in water using solid phase micro extraction procedures. *Water Research*, v. 32, p. 2140-2146, 1998.

LUNDGREN, B.V., GRIMVALL, A., SAVENHEAD, R. Formation and removal of off-flavour compounds during ozonation and filtration through biologically active sand filters. *Water Science and Technology*, v. 20, n. 8/9, p. 245-253, 1988.

MACDOWALL, B., HOEFEL, D., NEWCOMBE, G., SAINT, C.P., HO, L. Enhancing the biofiltration of geosmin by seeding sand filter columns with a consortium of geosmin-degrading bacteria. *Water Research*, v. 43, p. 433-440, 2009.

MARTIN, J.F., BENNETT, L.W., GRAHAM, W.H. Off-flavor in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) due to 2-methylisoborneol and its dehydration products. *Water Science and Technology*, v. 20, p. 99-105, 1988.

MATTHIENSEN, A., YUNES, J.S., CODD, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Revista Brasileira de Biologia*, São Carlos, v. 59, n. 3, p. 361-376, 1999.

MENEGAT, R.. *et al. Atlas Ambiental de Porto Alegre*. UFRGS-PMPA-INPE. Ed. Universidade, Porto Alegre, 1998.

MOCHIDA, K. Evaluation of the Cytotoxicity of Geosmin and 2-Methylisoborneol using cultured human, monkey and dog cells. *Biocontrol Science*, v. 14, n. 1, p. 35-38, 2009.

MÜLLER, C.C., RAYA-RODRIGUEZ, M.T., 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, p. 29-39, 2009.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 695-700, 1993.

NAMKUNG, E., RITTMANN, B.E. Removal of taste-and odor-causing compounds produced by biofilmes grown on humic substances. *Journal American Water Works Association*, v. 79, p. 107-112, 1987.

NARAYAN, L.V., NUNEZ, W.J. Biological control and bacterial oxidation of the taste and odor compound geosmin. *Journal American Water Works Association*, v. 66, p. 532-536, 1974.

NERENBERG, R., RITTMANN, B.E, SOUCIE, W.J. Ozone/biofiltration for removing MIB and geosmina. *Journal American Water Works Association*, v. 92, p. 85-95, 2000.

NEWCOMBE, G.; DONATI, C.; DRIKAS, M.; HAYES, R.. Adsorption onto activated carbon: electrostatic and non-electrostatic interactions. *Water Supply*, n. 14, p. 129, 1994.

NEWCOMBE, G., COOK, D.. Influences on the removal of tastes and odours by PAC. *Journal of Water Supply: Research and Technology*, v. 51, p. 463-474, 2002.

NG, C., LOSSO, J.N., MARSHALL, W.E., RAO, R.M. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmina-water system. *Bioresource Technology*, v. 85, p. 131-135, 2002.

OIKAWA, E., SHIMIZU, A., ISHIBASHI, Y. 2-Methylisoborneol degradation by the CAM operon from *Pseudomonas putida* PpG1. *Water Science and Technology*, v. 31, n. 11, p. 79-86, 1995.

OXENFORD, J.L., LYKINS, W.Jr. Conference summary: Practical aspects of the design and use of GAC. *Journal American Water Works Association*, v. 83, n. 1, p. 58-64, 1989.

PIET, G.J., ZOETEMAN, B.C.J., KRAAYEVELD, A.J.A. Earthy smelling substances in surface waters of the Netherlands. *Water Treatment and Examination*, v. 21, p. 281-286, 1972.

PIETSCH, J., BORNMANN, K., SCHMIDT, W. Relevance of intra- and extracellular cyanotoxins for drinking water treatment. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, v. 30, n. 1, p. 7-15, 2002.

PUDDU, A., ZOPPINI, A., FAZI, S., ROSATI, M., AMALFITANO, S., MAGALETTI, E. Bacteria uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. *FEMS Microbiology Ecology*, v.46, p. 257-268, 2003.

RICHARDSON, R.E., BHUPATHIRAJU, V.K., SONG, D.L., GOULET, T.A., ALVAREZ-COHEN, L. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environmental Science & Technology*, v. 36, p. 2652-2662, 2002.

RITTMANN, B.E., GANTZER, C.J., MONTIEL, A. *Biological treatment to control taste-and-odor compounds in drinking water treatment*. In: Suffet, I.H., Mallevalle, J. Kawczynski, E. (Eds.), *Advances in Taste-and-Odor Treatment and Control*. American Water Works Association Research Foundation, Denver, USA, pp. 209-246, 1995.

ROSEN, A.A., MASHNI, C.I., SAFFERMAN, R.S. Recent developments in the chemistry of odour in water: the cause of earthy-musty odour. *Water Treatment and Examination*, v. 19, p. 106-119, 1970.

SAADOUN, I., EL-MIGDADI, F. Degradation of geosmin-like compounds by selected species of Gram-positive bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, p.98-100, 1998.

SAITO, A., TANAKA, A., ORITANI, T. A practical synthesis of enantiomerically pure (-) geosmina via highly diastereoselective reduction of (4aS,8S)-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a,8-dimethyl-2(3H)-naphthalenone. *Tetrahedron: Asymmetry*, v.7, p. 2923-2928, 1996.

SAITO, A., TOKUYAMA, T., TANAKA, A., ORITANI, T., FUCHIGAMI, K. Microbiological degradation of (-)-geosmin. *Water Research*, v. 33, n. 13, p. 3033-3036, 1999.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2 ed. CSHLP. USA, 1989.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. *Identificação e ilustração dos principais gêneros*. In: SANT'ANNA, C.L. et al. *Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras*. Rio de Janeiro. Interciência. 2006. p. 35-53.

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P., WERNER, V.R., DOGO, C.R., RIOS, F.R., CARVALHO, L.R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, v. 126, p.249-263, 2008.

SCHUMANN, R., PENDLETON, P. Dehydration products of 2-methylisoborneol. *Water Research*, v. 31, n. 5, p. 1243-1246, 1997.

SEREDYNSKA-SOBECKA, B., TOMASZEWSKA, M., JANUS, M. Biological activation of carbon filters. *Water Research*, v. 40, p. 355-363, 2006.

SERVAIS, P., BILLEN, G., BOUILLOT, P. Biological colonization of granular activated carbon filters in drinking water treatment. *Journal of Environmental Engineering*, v. 120, n. 4, p. 888-899, 1994.

SIGEE, D. *Freshwater Microbiology. Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons: Chichester, UK, p. 328-338, 2005.

SILVEY, J.K.G., ROACH, A.W. Studies on microbiotic cycles in surface water. *Journal American Water Works Association*, v. 56, p. 60, 1964.

SILVEY, J.K.G., HENLEY, A.W., NUNEZ, W.J., COHEN, R.C. *Biological control: control of naturally occurring taste and odors by microorganisms*. In: *Proceedings of the National Biological Congress, Detroit, USA, 1970*.

SILVEY, J.K.G., HENLEY, D.E., HOHEN, B., NUNEZ, W.J. *Musty-earthly odors and their biological control*. *Proceedings of the American Water Works Association. Conference on Water Quality Control, Atlanta, 1975*.

SINGH, R., PAUL, D., JAIN, R.K. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, v. 14, p. 389–397, 2006.

SIVONEN, K., JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I., BARTRAM, J. (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon, 1999. cap. 3, p. 41-111.

SNOEYINK, V.L. Adsorption of organic compounds. In: Pontius, F.W. (Ed.). *Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies*. Nova York: McGraw Hill, 1990. cap. 13. p. 781-867.

SPEITEL JR, G.E., DIGIANO, F.A. The bioregeneration of GAC used to treat micropollutants. *Journal American Water Works Association*, v. 79, n. 1, p. 64-73, 1987.

SPEITEL JR, G.E., TURAKHIA, M.H., LU, C.J. Initiation of micropollutant biodegradation in virgin GAC columns. *Journal American Water Works Association*, v. 81, n. 4, p. 168-176, 1989.

STACKEBRANDT, E., EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, v. 33, p. 152-155, 2006.

STEFENS, J.L.; ZAT, M.; BENETTI, A.D. *Aplicação de metodologia analítica empregando microextração em fase sólida e cromatografia para a determinação de compostos odoríferos em mananciais de abastecimento de água*. In: XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 2008, Santiago, Chile.

SUFFET, I.H., CORADO, A., CHOU, D., MAGUIRE, M., BUTTERWORTH, S. AWWA taste and odor survey. *Journal American Water Works Association*, v. 88, n. 4, p. 166-180, 1996.

SUGIURA, N., HIROKO, I., MAEKAWA, T. Degradation potential of musty odour in a drinking water source by a biofilm method. *Journal of Water Supply: Research and Technology*, v. 52, n. 3, p. 181-187, 2003.

SUGIURA, N., UTSUMI, M., WEI, B., IWAMI, N., OKANO, K., KAWAUCHI, Y., TAKAOKI, M. Assessment for the complicated occurrence of nuisance odours from phytoplankton and environmental factors in a eutrophic lake. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, v. 9, p. 195-201, 2004.

SUMITOMO, H. Odor decomposition by yeast *Candida*. *Water Science and Technology*, v. 20, n. 8/9, p. 157-162, 1988.

SUMITOMO, H. Biodegradation of 2-methylisoborneol by gravel sand filtration. *Water Science and Technology*, v. 25, p. 191-198, 1992.

- SWIATKOWSKI, A. "Industrial carbon adsorbents". In: Dabrowski, A. (Ed.) Adsorption and its Applications in Industry and Environmental Protection: Studies in Surface Science and Catalysis. Poland, p. 69-93, 1998.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599, 2007. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- TANAKA, A., ORITANI, T. UEHARA, F., SAITO, A., KISHITA, H., NIIZEKI, Y., YAKOTA, H., FUCHIGAMI, K. Biodegradation of a musty odour component, 2-methylisoborneol. *Water Research*, v. 30, n. 3, p. 759-761, 1996.
- TEIXEIRA, V.G., COUTINHO, F.M.B., GOMES, A. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas a base de divinilbenzeno. *Química Nova*, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.
- TERAUCHI, N., OHTANI, T., YAMANAKA, K., TSUJI, T., SUDOU, T., ITO, K. Studies on a biological filter for musty odor removal in drinking water treatment processes. *Water Science and Technology*, v. 31, n. 11, p. 229-235, 1995.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 4876-4882, 1997.
- TUNG, S.-C., LIN, T.-F., YANG, F.-C., LIU, C.-L. Seasonal change and correlation with environmental parameters for 2-MIB in Feng-Shen Reservoir, Taiwan. *Environ. Monit. Assess.*, v. 145, p. 407-416, 2008.
- UTERMHÖHL, H. Zur Vervollkommung der Quantitativew Phytoplankton metodik. *Mitteilungen der Internationalen Vreinigung für theoretische und angewandte limnologie*, Stuttgart. v. 9, p. 1-38, 1958.
- UWINS, H.K., TEASDALE, P., STRATTON, H. A case study investigating the occurrence of geosmina and 2-methylisoborneol (MIB) in the surface waters of the Hine Dam, Gold Coast, Australia. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 5, p. 231-238, 2007.
- VILALTA, E., GUASCH, H., MUÑOZ, I., ROMANI, A., VALERO, F., RODRIGUEZ, J.J., ALCARAZ, R., SABATER, S. Nuisance odours produced by benthic cyanobacteria in a Mediterranean river. *Water Science and Technology*, v. 49, n. 9, p. 25-31, 2004.
- VINITNANTHARAT, S., RATTANASIRISOPHON, W., ISHIBASHI, Y. Modification of granular activated carbon surface by chitosan coating for geosmin removal: sorption performances. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 5, p. 145-152, 2007.

YAGI, M., KAJINO, M., MATSUO, U., ASHITANI, K., KITA, T., NAKAMURA, T. Odour problems in Lake Biwa. *Water Science and Technology*, v. 15, n. 6/7, p. 311-321, 1983.

YAGI, M., NAKASHIMA, S., MURAMOTO, S. Biological degradation of musty odour compounds, 2-methylisoborneol and geosmin, in a bio-activated carbon filter. *Water Science and Technology*, v. 20, n. 8/9, p. 255-260, 1988.

YEN, H., LIN, T., TSENG, I., TUNG, S., HSU, M. Correlation 2-MIB and microcystin concentrations with environmental parameters in two reservoirs in south Taiwan. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 5, p. 33-41, 2007.

YOUNG, W.F., HORTH, H., CRANE, R., OGDEN, T., ARNOTT, M. Taste and odor threshold concentrations of potential potable water contaminants. *Water Research*, v. 30, n. 2, p. 331-340, 1996.

YU-HSIANG, S., TZU-YING, L., SHANG-DA, H. Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, v. 65, n. 2, p. 518-524, 2005.

YURKOWSKI, M., TABACHEK, J.L. Geosmin and 2-methylisoborneol implicated as a cause of muddy odor and flavor in commercial fish from Cedar Lake, Manitoba. *Canadian Journal Fish Aquatic Science*, v. 37, p. 1449-1450, 1980.

WATSON, S., BROWNLEE, B., SATCHWILL, T., HARGESHEIMER, E.E. Quantitative analysis of trace levels of geosmin and MIB in source and drinking water using headspace SPME. *Water Research*, v. 34, p. 2818-2828, 2000.

WESTERHOFF, P., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M., SOMMERFELD, M. Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs. *Water Research*, v. 39, n. 20, p. 4899-4912, 2005.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for drinking-water quality*. 3. ed. Geneva, 2004. p. 210-220.

WHITELEY, M., BANGERA, M.G., BUMGARNER, R.E., PARSEK, M.R., TEITZEL, G.M., LORY, S., GREENBERG, E.P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, v. 413, p. 860–864, 2001.

WQA, 2001. The 2001 National Consumer Water Quality Survey (Report). *Water Quality Association*, Lisle, IL, 13pp.

ZIMBA, P.V., DIONIGI, C.P., MILLIE, D.F. Evaluating the relationship between photopigment synthesis and 2-methylisoborneol accumulation in cyanobacteria. *Journal of Phycology*, v.35, n. 6, p. 1422–1429, 1999.

Capítulo VIII

Anexos



8. ANEXOS

8.1 Meio Mineral (MM)

NH ₄ Cl	50 mg/l
K ₂ HPO ₄	100 mg/l
MgSO ₄	50 mg/l
CaCl ₂	20 mg/l
FeCl ₃	1 mg/l
Ágar	

8.2 Ágar Padrão para Contagem (PCA)

Peptona	0,5 g
Extrato de levedura	0,25 %
Glicose	0,1%
Ágar	1,5%

8.3 BHI (Caldo infuso de cérebro e coração)

NaCl	5,0 g
Dextrose	2,0 g
Na ₂ PO ₄	2,5 g
Infuso de cérebro e coração*	17,5 g
Peptona de carne	5,0 g
Peptona de caseína	5,0 g
* Infuso de cérebro e coração: 12,5 g (cérebro de carneiro) + 5,0 g (coração de boi)	

8.4 TE 1X (10mM TRIS*, 25mM EDTA*, pH 8)

Tris	1,0 ml
EDTA	5,0 ml
Água	94,0 ml

8.5 SDS (10%)

SDS	10,0 g
Água	100 ml

8.6 Lisozima (10 mg/ml)

Lisozima	0,01 g
Água	1,0 ml

8.7 Proteinase K (20 mg/ml)

Proteinase K	0,02 g
Água	1,0 ml

8.8 Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1)

Fenol	48,0 ml
Clorofórmio	48,0 ml
Álcool isoamílico	2,0 ml

8.9 Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)

Clorofórmio	96,0 ml
Álcool isoamílico	4,0 ml

8.10 TE (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8)

Tris	1,0 ml
EDTA	0,2 ml
Água	98,8 ml

8.11 Gel de agarose (0,8%)

Agarose	1,0 g
TAE 1X	100,0 ml
Brometo de etídeo	5,0 µl

8.12 Brometo de etídeo

Brometo de etídeo	0,5 mg
Álcool etílico	1000,0 ml

8.13 TAE 1X

TAE 50X*	20,0 ml
Água	980,0 ml

8.14 Desoxinucleotídeos

dATP	5,0 µl
dTTP	5,0 µl
dCTP	5,0 µl
dGTP	5,0 µl

* Solução estoque: Tris 1M

Tris	12,1 g
Água	100,0 ml

* Solução estoque: EDTA 0,5M

EDTA	18,6 g
Água	100,0 ml

* Solução estoque: TAE 50X

Tris	240,0 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M	100,0 ml
Água para completar	1000,0 ml