

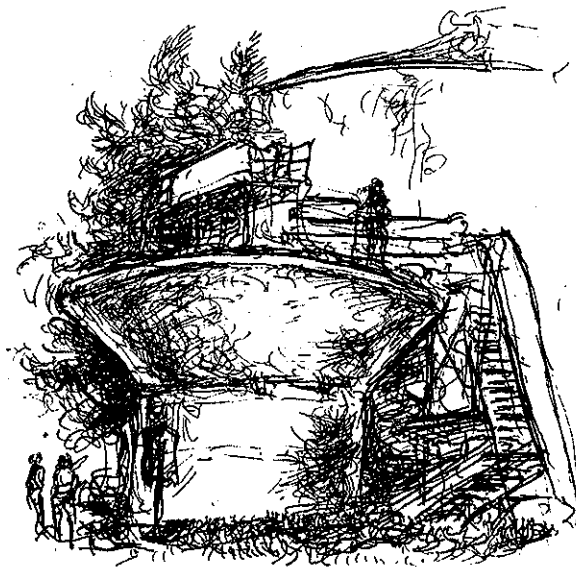
Lodo de esgoto granulado: identificação bacteriana¹

Rosana Filomena Vazoller²
Célia Maria Rech²
Maria da Glória Figueiredo²
Luis Antonio Gijaj-Levra²

RESUMO Os seguintes gêneros de bactérias não-metanogênicas foram isolados e identificados de lodo granulado proveniente de um reator UASB operado com esgotos domésticos: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Desulfovibrio desulfuricans* e 5 culturas de *Clostridium* sp. Esses gêneros estão relacionados com as fases hidrolítica e acetogênica, e com a redução do íon sulfato na digestão anaeróbia. Outra cultura de bactéria isolada parece pertencer ao gênero *Desulfotomaculum*. *Methanobacterium* sp e *Methanotrix* sp foram os dois grupos de bactérias metanogênicas encontrados. O lodo granulado apresentou valor de atividade metanogênica específica da ordem de 0,15g DQO-CH₄/gSSV.d¹, com grânulos esféricos (diâmetro de 4mm em média), resistentes e escuros.

SUMMARY Species of non-methanogenic bacteria were isolated and identified in granular sludge from UASB reactors, treating domestic sewage: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp, *Desulfovibrio desulfuricans*. These species are related to the hydrolytic and acetogenic phases and with the sulphate ion reduction in anaerobic digestion. It was also noticed bacteria similar to *Desulfotomaculum*. Two genus of methanogenic bacteria were isolated: *Methanobacterium* sp and *Methanotrix* sp. The granular sludge presented specific methanogenic activity values of about 0.15g COD-CH₄/gVSS.d¹, with spherical (diameter about 4mm), resistant and dark granules.

Os fenômenos de agregação de células e formação de biofilmes em suportes inertes, tornaram-se muito importantes para os estudos sobre digestão anaeróbia, devido ao desenvolvimento dos novos tipos de biodigestores, cuja característica principal é a boa retenção da massa bacteriana em seu interior.



Os exemplos de biodigestores avançados mais conhecidos são: filtros anaeróbios, reatores preenchidos com um material suporte inerte no qual um filme bacteriano ou biofilme se desenvolve; reator de leito fluidificado, onde grãos de areia agem como suporte inerte para formação do biofilme; reatores de fluxo ascendente e manto de lodo (UASB), no qual condições inerentes ao próprio sistema promovem a formação de grânulos bacterianos. O conhecimento dos fatores que conduzem à formação dos grânulos e do biofilme tem, portanto, grande interesse para o controle e operação dos reatores anaeróbios.

Tem sido demonstrado que a ação conjunta desses fatores que têm origem biológica, física e química é a responsável pela formação do lodo granulado. Os aspectos biológicos do sistema têm sido estudados em caráter descritivo, isto é, as células bacterianas presentes nos grânulos, vêm sendo isoladas e identificadas, porém muito pouco tem sido elucidado sobre a fisiologia e metabolismo dessas células para melhor compreensão do fenômeno de agregação.

Hulshoff Pol *et alii* (1) descreveram a presença de *Methanotrix* sp e *Methanosarcina* sp em estudo sobre fatores que afetam a partida e a granulação em reatores UASB. Brummeler *et alii* (2) e Dolfing *et alii* (3) confirmaram

1. Poster apresentado no 5º Simpósio Internacional de Digestão Anaeróbia-Bologna-Itália — 22 a 26 de maio de 1988.

2. Biólogos da Cetesb

a presença predominante da metanogênica acetotrófica do gênero *Methanotrix* sp em digestores operando com uma mistura de ácidos acético e propiônico e com água residual de usina açucareira, respectivamente.

Novaes *et alii* (4) apresentaram resultados sobre a presença de um bacilo acetotrófico formando longas cadeias, semelhante a *Methanotrix* sp em reatores UASB operando com efluente de cervejaria. Além das espécies metanogênicas, esse trabalho apresenta os resultados de isolamento e identificação de bactérias não-metanogênicas presentes nos grânulos de reator UASB operando com esgoto doméstico.

Materiais e métodos

1. Reator de enriquecimento

Um reator de 1l foi inoculado com grânulos esféricos (diâmetro de 4mm), resistentes e escuros, originados de um reator UASB para o tratamento de esgotos domésticos (5). O meio de cultura no reator, foi descrito por Karube *et alii* (6) e a temperatura foi controlada em 30°C.

2. A composição dos meios de cultura para os procedimentos de isolamento foi descrita por: Salinitro (7), meio para bactérias não-metanogênicas totais¹; Postgate (8), meio E para bactérias redutoras do íon sulfato; Bryant (9) meio para bactérias metanogênicas acetotróficas e hidrogenotróficas; Huser *et alii* (10) meio para bactérias metanogênicas acetotróficas.

3. Procedimentos para a manipulação de anaeróbios estritos:

Método do "roll-tube" descrito por Hungate (12) modificado por Bryant (9) e com as adaptações descritas no

manual técnico da Cetesb, sobre contagens de bactérias anaeróbias (11).

4. Testes para identificação bacteriana:

Análise das características morfológicas das colônias e das células bacterianas foram feitas em estereomicroscópio (40x) e microscopia de contraste de fase (1250x), respectivamente.

As características fisiológicas foram analisadas através dos seguintes testes: coloração de gram, verificação de anaerobiose estrita, liquefação de gelatina, hidrólise de caseína, produção de catalase e oxidase, motilidade, crescimento em ágar sangue e nos substratos utilizados. Análise de alguns produtos do metabolismo bacteriano tais como: ácidos voláteis orgânicos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico), etanol, e composição dos gases (H₂S, CH₄ e CO₂) foram realizadas por cromatografia gasosa (cromatógrafo CG — 500).

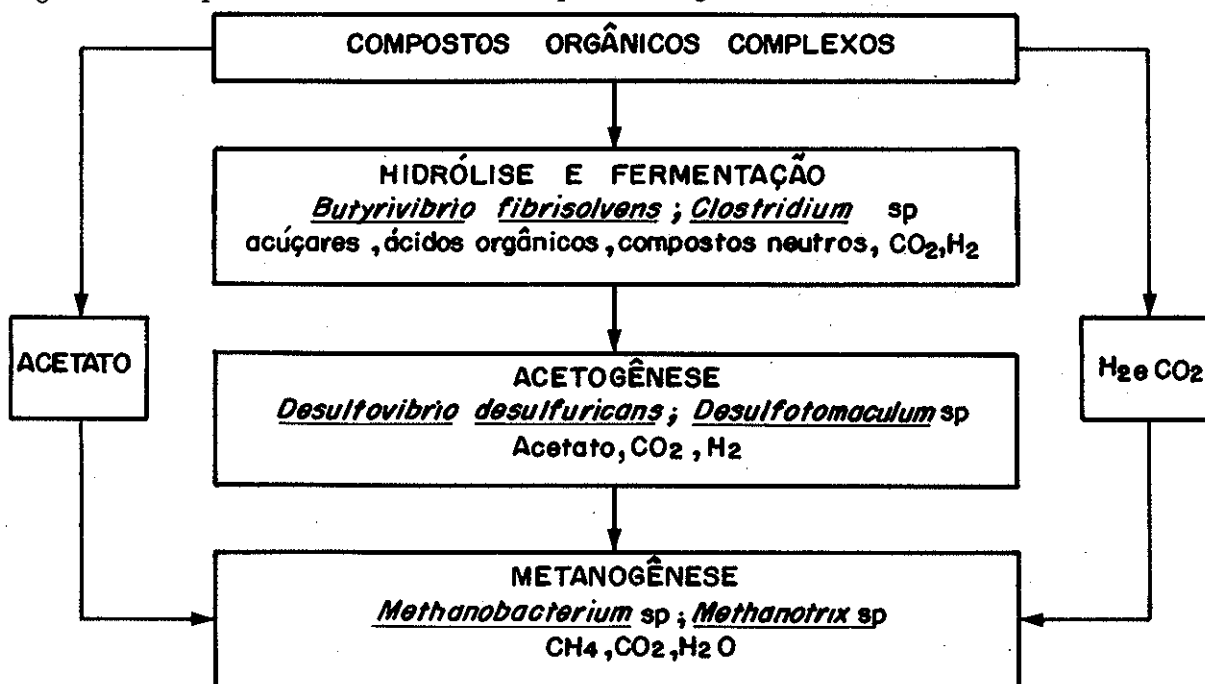
5. Testes para medida da atividade metanogênica específica foram efetuados segundo de Zeeuw (13).

Resultados e Conclusões

Nos grânulos provenientes do reator UASB operando com esgotos domésticos foi verificada a presença de espécies de bactérias metanogênicas e não-metanogênicas. Isto sugere a formação de um microambiente no grânulo, onde ocorrem trocas entre os diversos grupos de bactérias como tem sido evidenciado nas etapas bioquímicas da digestão anaeróbia (14).

A *fig. 1* mostra os grupos de bactérias isolados, os quais caracterizam os três passos da digestão anaeróbia: hidrólise e fermentação, acetogênese e metanogênese. Com os re-

Figura 1 — Grupos de bactérias isolados e os 3 passos da digestão anaeróbia.



Nota: 1 Meios de cultura modificados nos laboratórios de anaeróbios da CETESB (11).

sultados de identificação dos tipos de bactérias, foi possível a descrição de vias de utilização de compostos e formação de produtos no reator, de acordo com os dados descritos em literatura (8,15,16), como pode ser visto na *Tabela 1*. Os ácidos voláteis orgânicos produzidos pelas culturas não-metanogênicas estão descritos separadamente na *Tabela 2*. Na fase metanogênica foram encontradas a bactéria hidrogenotrófica do gênero *Methanobacterium* sp e um bacilo gram-negativo, acetotrófico, formando longos fila-

mentos, o qual parece pertencer ao gênero *Methanotrix* sp.

A atividade específica metanogênica do lodo foi em média 0,15g DQO-CH₄/gSSV.d¹, um valor considerado baixo em relação aos valores obtidos por de Zeeuw (13) para lodos granulados. Assim, estudos estão sendo realizados a fim de se adaptar melhores técnicas na avaliação da atividade metanogênica de lodos anaeróbios provenientes de reatores UASB tratando esgoto doméstico.

Tabela 1 — Degradação de compostos e formação de produtos na digestão anaeróbia.

1 — Bactérias hidrolíticas fermentativas — celulolíticas:	
Celulose ————— celobiose + glicose —————	lactato + etanol + acetato + CO ₂ + H ₂
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
Celulose ————— celobiose —————	butirato + lactato + H ₂ + CO ₂
glicose —————	butirato + lactato + H ₂ + CO ₂
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ¹	
Hexoses	
(celobiose glicose) —————	butirato + etanol + CO ₂ + H ₂ O + 2
Clostrídios	
Celobiose ————— glicose 1P —————	etanol + acetato + lactato + butirato + formiato
	+ succinato + CO ₂ + H ₂
	glicose ————— etanol + acetato + lactato + butirato + formiato
	+ succinato + CO ₂ + H ₂
<i>Clostrídios</i> ¹	
Hexoses	
(celobiose, glicose) —————	acetato + propionato + isobutirato + isovalerato
	+ etanol + CO ₂ + H ₂ + 2
2 — Bactérias acetogênicas produtoras de H₂	
Bactéria redutora do íon sulfato (crescida em baixas concentrações de SO₄⁼)	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ¹	
Lactato —————	acetato + CO ₂ + H ₂
Ácidos orgânicos —————	acetato + CO ₂ + H ₂
<i>Desulfotomaculum</i> sp ¹	
Lactato —————	acetato + CO ₂ + H ₂
Etolol —————	acetato + CO ₂ + H ₂
<i>D. desulfuricans</i> ¹	
Lactato + SO ₄ ⁼² —————	acetato + H ₂ S +
3 — Bactérias metanogênicas	
Hidrogenotrófica: <i>Methanobacterium</i> sp ¹	
H ₂ + CO ₂ —————	CH ₄ + H ₂ O
Acetotrófica: <i>Methanotrix</i> sp ¹	
acetato —————	CH ₄ + CO ₂

NOTAS: 1 — Bactérias estudadas

2 — Produtos não identificados

Tabela 2 — Formação de ácidos orgânicos pelas bactérias isoladas

TIPOS DE BACTÉRIAS	PRODUTOS
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	butírico ¹
<i>Clostridium</i> sp ² cult. 1	acético, propiônico, isobutírico, isovalérico ¹
	acético, propiônico, isobutírico, isovalérico ¹
	acético, propiônico, isobutírico, isovalérico ¹
	acético, propiônico ¹
	acético, propiônico, isobutírico, isovalérico
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	acético ¹

NOTAS: 1 — Detecção de etanol

2 — Diferença entre as culturas quanto ao tamanho das células e posição dos esporos

Referências Bibliográficas

1. HULSHOFF POL, L.W., de ZEEUW, W.J., VELZE BOER, C.T.M. and LETTINGA, G. Granulation in UASB reactors. *Wat. Sci. Tech.*, 15: 291-304, 1983.
2. ten BRUMMELER, E., HULSHOFF POL, L.W., DOLFING, J., LETTINGA, G., and ZEHNDER, A.J.B. Methanogenesis in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at pH 6 on acetatepropionate mixture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(6): 1472-1477, 1985.
3. DOLFING, J., GRIFFIOEN, A., van NEERVEN, A.R.W. and ZEVENHUIZEN, L.P.T. Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can J. Microbiol.*, 31: 744-750, 1985.
4. NOVAES, R.F.V., MACHADO, S.P., e SOUZA, M.E. Estudos sobre a granulação bacteriana em biodigestores de fluxo ascendente. Resumo de trabalhos. Sociedade Brasileira de Microbiologia. In: Simpósio Nacional de Fermentação — VI SINAFERM. Ceará, Brasil, 1984.
5. VIEIRA, M. M. S. & SOUZA, M. E. Development of technology for the use of the UASB reactor in domestic sewage treatment. *Wat. Sci. Tech.*, 18(12): 109-121, 1986.
6. KARUBE, I., KURIYAMA, S., MATSUNAGA, T. and SUZUKI, S. Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria. *Biotech. and Bioeng.*, 22: 847-857, 1980.
7. SALINITRO, J.P., FAIRCHILD, J.G. e ZGOR-NICKI, Y.D. Isolation culture characteristics and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Appl. Microbiol.* 27(4): 678-687, 1984.
8. POSTGATE, J.R. The sulphate-reducing bacteria. 2ª ed. Cambridge University Press, 208 p., 1984.
9. BRYANT, M.P. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American J. Clin. Nutr.* 25: 1324-1328, 1972.
10. NOVAES, R.F.V. Manual de Microbiologia de Anaeróbios — CETESB, 33 p., 1984.
11. HUNGATE, R.E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology*, 3B: 117-132, 1969.
12. HUSER, B.A., WUHRMANN, K. and ZEHNDER, A.J.B. *Methanotrix soehngenii* gen. nov. s.p. nov., a new acetotrophic non-hydrogen oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.*, 132: 1-9, 1982.
13. de ZEEUW, W. Startup of UASB-reactors. PhD thesis University of Wageningen — Netherlands, 156 p., 1984.
14. NOVAES, R.F.V. Microbiology of anaerobic digestion. *Wat. Sci. Tech.*, 18(12): 1-14, 1986.
15. LUNGDAHAL, L.G. & ERICSSON, K. E. Ecology of microbial cellulose degradation. *Adv. Microbiol. Ecology*, 8: 237-99, 1985.
16. HUNGATE, R.E. Methane formation and cellulose digestion, biochemical ecology and microbiology of the rumen ecosystem. *Experientia*, 38: 189-192, 1982.

