

ARQUIVO TECNICO

Estudos Bioquímicos e Microbiológicos da Digestão Anaeróbia do Lixo Urbano - Bactérias Anaeróbias Proteolíticas

Maio/90

5308
G347e(RCET)
035494



11685

035494

NEAMENTO AMBIENTAL

Maria da Glória Figueiredo



CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA Prof. Dr. Lucas Nogueira Garcez
Av. Prof. Frederico Hermann Junior, 345 - Pinheiros
05489-900 - SÃO PAULO - BRASIL

Estudos Bioquímicos e Microbiológicos da Digestão Anaeróbia do Lixo Urbano - Bactérias Anaeróbias Proteolíticas

Maio/90

S:	
N:	
R:	5308
	6347e(RCET)
	035494

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Luiz Antonio Fleury Filho

Governador

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

Alaôr Caffé Alves

Secretário

CETESB

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Walter Lazzarini

Diretor-Presidente

Carlos Pedro Jens

Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologia

Lineu Rodrigues Alonso

Diretor de Controle da Poluição de Regiões Metropolitanas

Luiz Antonio Ercolin

Diretor de Treinamento e Transferência de Tecnologia

Carlos Pedro Jens

Diretor de Normas e Padrões Ambientais

RESPONDENDO INTERINAMENTE

Ricardo Augusto Grecco Teixeira

Diretor Administrativo e Financeiro

Walter Godoy dos Santos

Diretor de Controle da Poluição do Interior

AUTOR

Biólogo (Analista de Pesquisa Ambiental)
Luis Antonio Giaj-Levra

Trabalho realizado na DTED - Setor de Pesquisa Tecnológica
de Sistemas de Tratamento de Efluentes Domésticos

Gerente da DTED - Sonia Maria Manso Vieira

Gerente da DTE - Pedro Alem Sobrinho

Gerente da DT - João Vicente de Assunção

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA Prof. Dr. Lucas Nogueira Garcez
Av. Prof. Frederico Hermann Junior, 345 - Pinheiros
05489-900 - SÃO PAULO - BRASIL

APRESENTAÇÃO

Este relatório encerra a participação da CETESB no projeto "Estudos Bioquímicos e Microbiológicos da Digestão Anaeróbia do Lixo Urbano" nº 26.448, financiado pela FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos e Coordenado pelo IPT. É o quarto relatório parcial e apresenta uma revisão sobre a degradação de proteínas em ambientes anaeróbios e sugere inóculo e alimentação a ser utilizado num digestor que pretende estudar degradação de proteínas, bem como metodologia a ser aplicada na avaliação quali e quantitativa da biomassa proteolítica de um biodigestor.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são parcela significativa de vários resí
duos , tais como, estrume de aves, esgoto doméstico ,
lixo urbano, resíduos de frigoríficos, de laticínios,
etc., sendo um dos substratos utilizados pelos mi
croorganismos na digestão anaeróbia.

Na primeira etapa metabólica da digestão, hidrólise
e fermentação, as bactérias anaeróbias proteolíticas
são responsáveis pela degradação de proteínas.

O conhecimento desses microrganismos e da bioquímica
de suas interações metabólicas através da avalia
ção quali e quantitativa da biomassa é importante pa
ra estabelecer correlações entre o desempenho do pro
cesso e a atividade dessa biomassa , bem como na otimi
zação do processo de digestão anaeróbia.

Para determinar métodos de avaliação quali e quantita
tiva de bactérias proteolíticas, basicamente é necessá
rio a seleção de um meio de cultura, do substrato pro
teico, das técnicas de contagem e isolamento e de um
inóculo adequado. Este trabalho tem como objetivo suge
rer metodologia a ser utilizada na avaliação quali
e quantitativa de bactérias anaeróbias proteolíticas
em sistema de digestão anaeróbia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácii
dos constituídos por grupos amina e grupos carboxila,
contendo portanto, C, O, N, H. Em determinadas proteíi
nas, S e P podem estar presentes.

Para que os materiais protéicos sejam utilizados como
recursos renováveis para produção de energia, é neces
sário que sejam hidrolizados através de tratamento bi
ológico.

Os tipos de microrganismos que promoverão a degradação
da proteína dependerão do tipo de resíduo (águas resi
duárias, lixo urbano, etc) e do tipo de tratamento

biológico. Essa variação é devido às características físico-químicas do resíduo temperatura, pH, presença de compostos orgânicos complexos, etc.

Na natureza, a degradação de proteínas é importante devido à sua participação nos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio, enxofre e carbono.

No processo de digestão anaeróbia, ocorrem inúmeras interações bioquímicas entre os microrganismos participantes das distantes etapas metabólicas deste processo.

Na etapa de hidrólise e fermentação de proteínas, as bactérias proteolíticas (hidrolíticas fermentativas) são as principais responsáveis pela conversão de proteína a produtos tais como proteoses, peptonas, polipeptídeos, dipeptídeos, α -aminoácidos e ácidos graxos como apresentados na figura 1.

A proteína é hidrolizada por ação enzimática (proteases) a peptídeos e aminoácidos, os quais são fermentados a ácidos graxos voláteis, CO_2 , H_2 , NH_4^+ , e S^{2-} (14).

Nos processos anabólicos, a amônia é a principal fonte de nitrogênio para o crescimento de bactérias anaeróbias podendo ser assimilada a aminoácidos de proteína microbiana (11).

No rúmen, um dos ambientes anaeróbios aonde também ocorre a degradação de proteínas, a fermentação primeiramente é sacaroclástica, depois proteoclástica, devido à maior concentração de carboidratos em relação a proteínas na alimentação do animal hospedeiro(10). A importância de proteínas como energia ou como monômeros para síntese celular, depende da razão entre carboidratos e nitrogênio na alimentação. A figura 2 mostra um esquema da interrelação de carboidratos e nitrogênio na hidrólise e fermentação no rúmen e a figura 3 a degradação de proteínas e o metabolismo do nitrogênio nesse ecossistema.

São características fundamentais para o estudo bioquímico e microbiológico da hidrólise e fermentação de proteínas dentro do processo de digestão anaeróbia, o conhecimento da estrutura espacial das proteínas, sua solubilidade e sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica (3), bem como o estudo dos microrganismos com suas



Fonte: SAWYER, C.N. & McCARTY, P.L. (1978) (16).

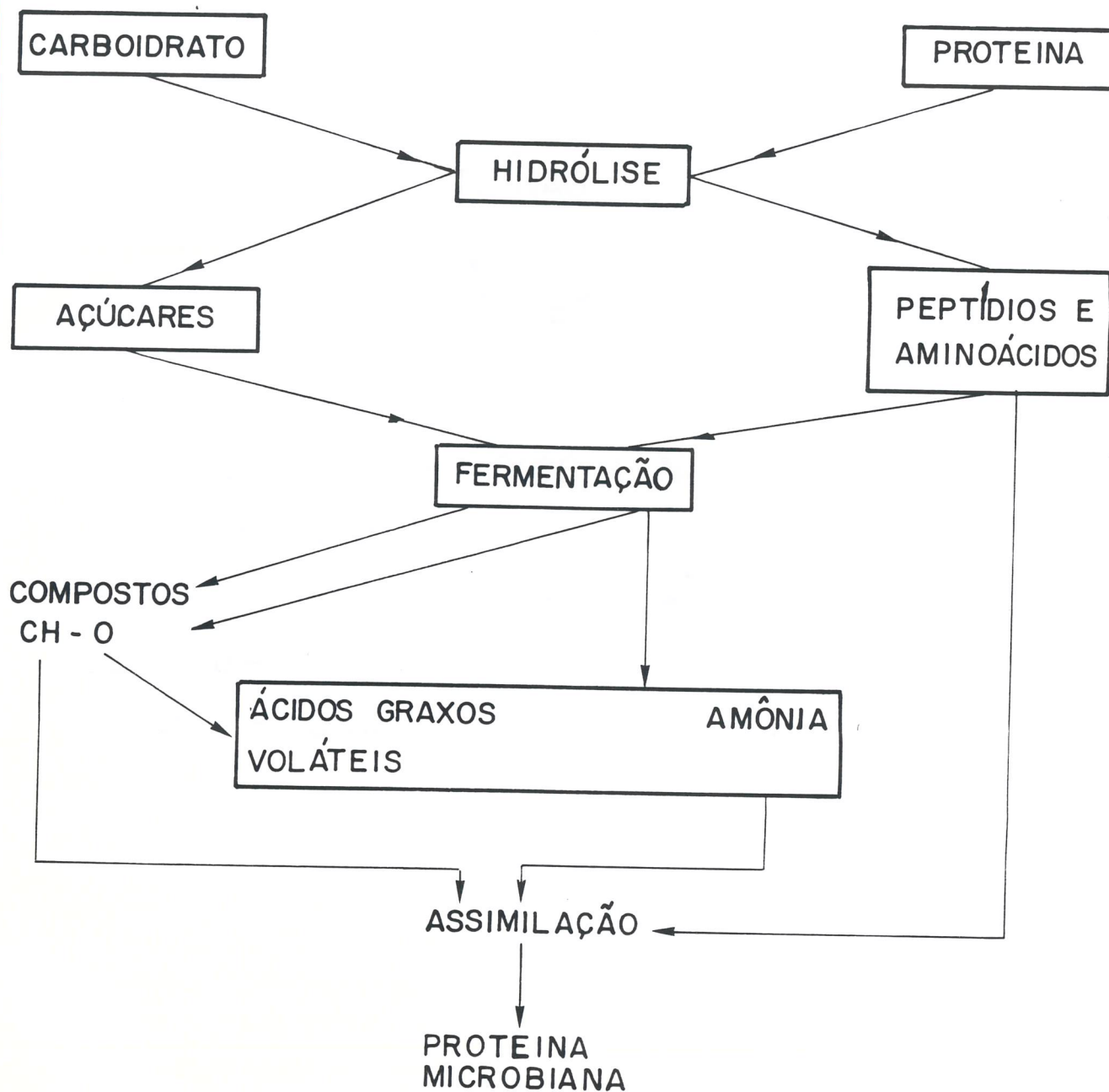


Figura 2: Uma das interações de carboidratos e nitrogênio no rúmen.

Fonte: HUNGATE, R.E., 1966 (11).

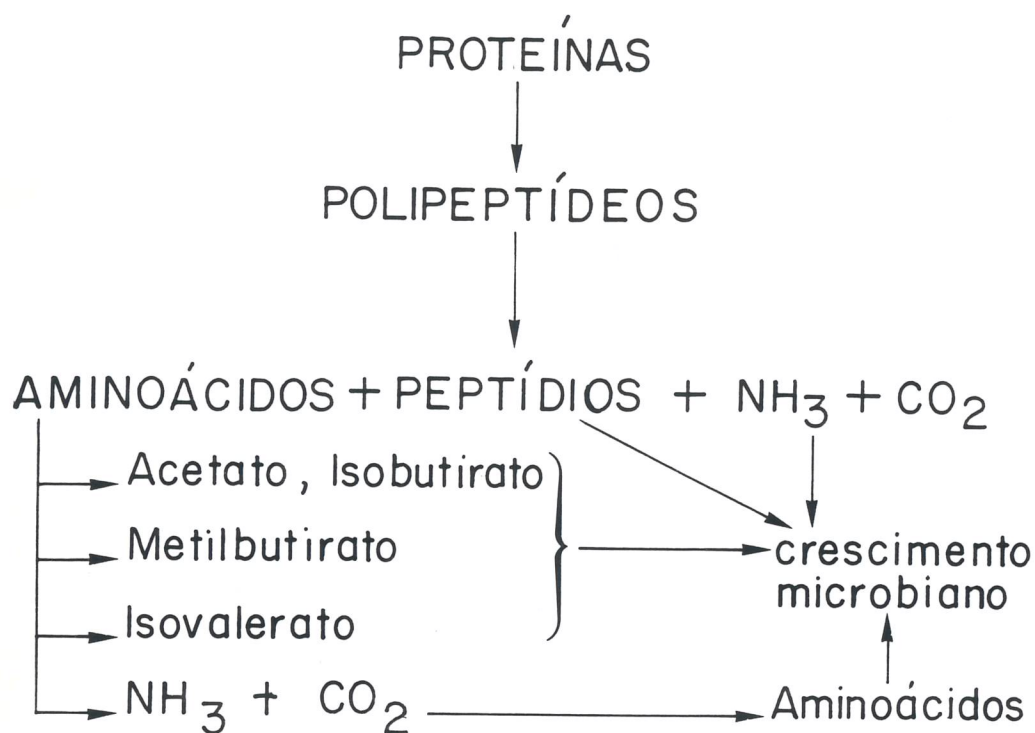


Figura 3: Degradação de proteína e metabolismo do nitrogênio no rúmen. (14).

enzimas específicas, frente a uma determinada composição de aminoácidos.

Em estudos de microbiologia, três proteínas são muito utilizadas: gelatina, albumina e caseína. A caseína segundo estudos nutricionais (6), é uma proteína completa ou seja, contém todos os aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, sersina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

Em diversos trabalhos, (18, 9, 5, 7), caseína foi utilizada na avaliação quali e quantitativa de bactérias proteolíticas de sistemas anaeróbios.

Cerca de 43% de bactérias isoladas de rúmen bovino cresceram em meio de cultura contendo caseína como o principal substrato (7).

No esgoto doméstico, as proteínas representam uma parcela significativa (27%) do total de matéria orgânica. Em contagens de bactérias proteolíticas em biodigestores de lodo de esgoto foram obtidas concentrações de 10×10^7 bactérias/ml e $6,5 \times 10^7$ bactérias/ml (21,18).

A via de degradação de proteínas em digestores de lodo, bem como em outros ambientes anaeróbios é provavelmente muito simililar à encontrada no rúmen. Em digestores porém, um grupo de bactérias anaeróbias gram positivas formadoras de esporos como Clostrídios proteolíticos são as responsáveis pela degradação de proteína e esse processo apresenta rendimento energético, (13, 18).

Jain & Zeikus em 1985, apud McInerney (14), observaram que Clostridium proteolyticum, recentemente isolado em lodo de esgoto hidrolizou várias proteínas e fermentou aminoácidos, levando à formação de acetato e CO_2 e pequenas quantidades de H_2 , isovalerato e isobutirato. Também relatam que Clostrídios proteolíticos tais como C. perfringens, C. bifermentans, C. histolyticum e C. sporogenes são importantes na deteriorização de alimentos enlatados e carnes.

Em isolamento e identificação de bactérias anaeróbias presentes em grânulos de um digestor de fluxo ascendente e manto de lodo tratando esgoto doméstico, verificou-se a presença de cinco espécies do gênero Clostridium, sendo

que duas demonstraram atividade proteolítica liquefazendo a gelatina (15).

Além das espécies do gênero Clostridium, em digestores de lodo foram isolados bacilos proteolíticos gram negativos não formadores de esporos como: Peptococcus anaerobicus, Befidobacterium sp. e Staphylococcus sp. (14).

No ecossistema do rúmen, Clostrídios são raramente encontrados e estas bactérias têm pouco ou nenhuma importância como agentes proteolíticos(10). Clostridium lochheadii e Clostridium longisporum, isolados de rúmen bovino apresentaram uma atividade celulolítica e fermentaram glicose (12). A pequena ou a não participação desse grupo de bactérias no conteúdo do rúmen deve-se ao fato de que o maior componente da alimentação do animal hospedeiro é a celulose, caracterizando desta forma uma fermentação sacaroclástica que prevalece sobre a proteoclástica.

No conteúdo do rúmen foram isolados as seguintes bactérias proteolíticas: Bacteroides ruminicola, Bacteroides amylophilus, Butyrivibrio sp., Selenomonas sp., Streptococcus bovis, Lachnospira multiparus e Eubacterium ruminantium. Em geral, proteínas, peptídeos ou aminoácidos não são utilizados como a única fonte de energia por essas bactérias porque não fornecem energia suficiente para o crescimento celular. As principais bactérias proteolíticas neste caso são gram negativas e também fermentam carboidratos (14).

Dentre as espécies de bactérias proteolíticas, Bacteroides amylophilus, Bacteroides ruminicola e Butyrivibrio fibrisolvens (4, 7, 8, 10), B. amylophilus apresentou alta atividade proteolítica.

3. SUGESTÕES PARA DIRECIONAMENTO DOS ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS COM BACTÉRIAS ANAERÓBIAS PROTEOLÍTICAS.

Como citado anteriormente, para determinar métodos de avaliação quali e quantitativa de bactérias proteolíticas, basicamente é necessário:

- Seleção de um meio de cultura que atenda às necessidades nutricionais dessas bactérias.
- Escolha de um substrato proteico que não seja fator limitante ao crescimento e atividade de diferentes linhagens proteolíticas, nos tubos de ensaio, como ocorria por exemplo no caso da ausência de certos aminoácidos importantes aos microrganismos.
- Seleção de Técnicas de contagem e isolamento para avaliação quali e quantitativa da biomassa.
- Escolha do inóculo mais adequado para a definição de metodologia, ou seja que apresente uma concentração elevada de bactérias proteolíticas.

Em estudos bioquímicos e microbiológicos da digestão anaeróbia do lixo urbano, sendo a celulose o maior componente do resíduo, o fluido de rúmen foi o inóculo mais apropriado para a seleção de meios de cultura e técnicas de contagem e isolamento de bactérias anaeróbias celulolíticas.

Na obtenção dos resultados da atividade celulolítica, o tempo de incubação das culturas variou de 4 a 7 dias, o que significa obter resultado relativamente rápido tratando-se de bactérias anaeróbias, cujo tempo de geração é superior as bactérias aeróbias. Este resultado foi favorecido pela concentração característica de bactérias presentes no rúmen, da ordem de grandeza de 10^8 - 10^9 bactérias/ml e pelo fato desse ecossistema, desde a década de 50, proporcionar muitas informações sobre a degradação de celulose. No caso da degradação de proteínas, não há tanta informação na literatura, pois um dos ecossistemas anaeróbios mais estudados é o rúmen, no qual a predominância de substrato é a celulose. Da mesma forma, conforme se observa na revisão da literatura (ver item 2), os microrganismos proteolíticos

presentes no rúmen não são os mesmos encontrados em biodigestores. Portanto, embora a via de degradação e formação de produtos seja similar, as informações obtidas com o rúmen não podem ser diretamente transportadas para biodigestores.

O lodo de esgoto parece ser o inóculo adequado para biodigestores que venham a receber elevadas cargas de proteína devido à alta concentração de bactérias (10^7 bact./ml) favorecido pela significativa parcela de proteínas no esgoto doméstico, e pela facilidade de obtenção do mesmo. Entre 3 substratos proteicos (gelatina, albumina, e caseína) utilizados em microbiologia, a gelatina apesar de ser considerada uma proteína de baixo valor biológico, pode ser empregada como substrato proteico em estudos de biodigestão em escala piloto, devido ao seu menor custo (17; 2; 1). Entretanto, a caseína, segundo estudos nutricionais (6), é uma proteína completa ou seja, contém todos os aminoácidos, parecendo ser o substrato mais apropriado nos estudos com bactérias anaeróbias proteolíticas, atendendo às necessidades nutricionais de diferentes linhagens.

Os resultados obtidos nos estudos com bactérias celulolíticas mostrou que o meio de cultura basal BCYT (MEIO BASAL CARBONATO-EXTRATO DE LEVEDURA-TRIPTICASE) descrito por TOUZEL, J.P. & ALBAGNAC, G. em 1983 (20) foi eficiente no cultivo dessas bactérias, obtendo-se resposta da atividade celulolítica em diluições do inóculo (10^{-8}) com tempo de incubação das culturas variando de 4 a 7 dias. O meio de cultura BCYT é um meio apropriado para o cultivo de diferentes bactérias anaeróbias. A seletividade deste meio será imposta pela adição de um substrato específico a um determinado grupo bacteriano, favorecendo seu crescimento e atividade. Tendo-se um substrato proteico adequado, o meio de cultura basal pode ser utilizado no cultivo de bactérias proteolíticas.

Em relação às técnicas de isolamento e contagem de bactérias proteolíticas, a técnica de roll-tube pode ser aplicada para isolamento dessa população específica e a forma de identificar microrganismos proteolíticos é através da visível utilização de caseína que turva o meio pela formação de zonas claras ao redor da colônia..

Dada à complexidade das moléculas proteicas, grande suscetibilidade a alterações do meio, e à diversidade de espécies que interagem bioquimicamente em sistemas anaeróbios, é importante salientar que para o estudo da conversação de proteínas na digestão anaeróbia, pode ser necessário um espaço de tempo maior do que o requerido nos estudos sobre hidrólise e fermentação de carboidratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BREURE, A.M.; BEEFTINK, H.H.; VERKUIJLEN, J.; and van ANDEL, J. G. Acidogenic fermentation of Protein / carbohydrate mixtures by bacterial populations adapted to one of the substrates in anaerobic chemostat. cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 245 - 299, 1986.
2. BREURE, A.M.; MOOIJMAN, K.A. and van ANDEL, J.G. Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 426 - 431, 1986
3. BREURE, A.M. Hydrolysis and Acidogenic Fermentation of Protein and Carbohydrates in anaerobic Waste Water Treatment, Tese de doutoramento apresentada à Universidade de Amsterdam, 1986.
4. BRYANT, M.P.; SMALL, N.; BOUMA, C. and CHU, H. Bacterioides ruminicola n. sp. and Succinomonas amylolytica: the new genus and species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. J. Bacteriol. 76: 15 - 23, 1958.
5. COTTA, M.A. & HESPELL, R.B. Proteolytic Activity of the Ruminal Bacterium Butyrivibrio fibrisolvens. Appl. and Env. Microbiol. 52: 1 51 - 58, 1986.
6. FAO/WHO. Energy and Protein Requirements, Report of a joint FAO/WHO and expert Committee. World Health Organization Techn. Rep. Ser. 552, WHO, Geneva, 1973.

7. FULGHUM, R.S. & MOORE, W.E.C. Isolation, Enumeration, and Characteristics of Proteolytic Ruminant Bacteria. J. Bacteriol. 85. 808 - 815, 1963.
8. HAZLEWOOD, G.P.; ORPIN, C.G.; GREENWOOD, Y. and Black, M.E. Isolation of proteolytic rumen bacteria by use of selective medium containing leaf fraction 1 protein (ribulose biophosphate carboxylase). Appl. Env. Microbiol 45: 1780 - 1784, 1983.
9. HOBSON, P.N. Rumen Bacteria Methods in Microbiology 3B, Ed by Norris J.R. and Robbins D.W. Academic Press London, 133 - 149, 1969.
10. HOBSON, P.N. The Microflora of the rumen. Meadowfield Press: 49 p., 1976.
11. HUNGATE, R.E. The rumen and it's microbes. Academic Press, London, 533 p. 1966.
12. HUNGATE, R.E. Microorganisms in the rumen of cattle fed o constant ration. Can. J. Microbiol 3, 289-311, 1957.
13. Mc INERNEY, M.J. & BRYANT, M.P.; Review of methane fermentation fundamentals. 19 - 47, in D.L. Wise (ed). Fuel gas production from biomass, 1: C.R.C. Press Boca Reton, Fle, 1981.
14. Mc INERNEY, M.J. Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats. and proteins. Biology of Anaerobic Microorganisms ed ZENDER, A.J.B.; chapter 8, 373-415, 1988.
15. NOVAES, R.F.V.; RECH, C.M. FIGUEIREDO, M.G. and GIAJ-LEVRA, L.A. Bacterial Identification of Granular Sludge UASB - reactor. Trabalho apresentado no Fifth Int. Symp. on A. Digestion. Italy, 61-64, 1988.

16. SAWYER, C.N. & McCARTY, P.L. Chemistry for environmental engineering third edition. McGRAW - HILL BOOK Company, 532 p, 1978.
17. SCHULZED, D. FIEBIG, R. and DELLWEEG, H. Development of Granular Sludge in the UASB - Treatment of model Waste Waters containing gelatine. Biotechnol. Lett. 10: 5, 319 - 324, 1988.
18. SIEBERT, M.L. & TOERIEN, D.F. The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sewage sludge. Water Research, 3: 241 - 250, 1969.
19. TOERIEN, D.F. & HAITINGH, W.H.J.; Anaerobic Digestion. In The Microbiology of anaerobic digestion Water Res. 3: 3. 385 - 416, 1969.
20. TOUZEL, J.P. & ALBAGNAC, C.G. Isolation and characterization of Methanococcus mazei stain Mc₃. FEMS Microbiol. Letters, 16: 241 - 245, 1983.
21. ZEIKUS, J.G. Microbiol populations in digesters . Stafford, D.A.; Weatley, B.I. and Hughes, D.E. Anaerobic Digestion. London, Applied Science Pubhishers, 61 - 89, 1980.

Data Aquis.:	21/10/99
Indic.:	
Livraria:	
Preço:	R\$
Data Tomba:	21/10/99



CETESB

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 - Pinheiros

Fone: 210-1100 - Telex 1183053-CETS-BR

CEP 05489 – São Paulo - SP – Brasil