XIX CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL
AIDIS – SANTIAGO, CHILE
11 al 16 de noviembre de 1984

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 - CEP. 05459 - Pinheiros
SÃO PAULO – BRASIL

BACTÉRIAS FOTOSSINTÉTICAS NO TRATAMENTO DE RESÍDUOS

Engº Vito Marcello Grieco
Biol. Iraci da S. Leme Monteiro
Limn. Hideo Kawai
Biol. Maria da Gloria Figueiredo
Engº Boris Schneiderman

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Diretoria de Pesquisa – GTRA
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345
São Paulo – Brasil – CEP 05459

ARQUIVO TECNICO

5312
G871b
015172

CETESB
03975
015172

CLASS
A
BOOK
5312
G871b
15172 ex 1

5312
G871b
015172

RESUMO

As bactérias fotossintéticas proliferam abundantemente na natureza e desempenham importante papel na purificação dos corpos d'água poluídos. Realizam ação fotossintética, como uma das formas importantes de metabolismo, através de pigmentos contidos nas células (bacterioclorofilas e carotenóides) e utilizam de forma pronunciada substâncias orgânicas, preferencialmente ácidos acético e propiônico. Além dessa notável eficiência na remoção de matéria orgânica, deve-se ressaltar que elas contêm elevados teores de proteínas e microelementos. Portanto, o sistema de tratamento que utiliza essas bactérias oferece ótimas perspectivas, não somente para o tratamento de efluentes com elevadas cargas orgânicas, mas também para o aproveitamento da biomassa produzida no sistema como excelente ração e/ou fertilizante.

Estudos preliminares foram realizados no sentido de se verificar o comportamento de uma cultura de bactérias fotossintéticas e heterotróficas em meio sintético. Para tanto, foram efetuadas contagens de bactérias fotossintéticas e heterotróficas, verificada a evolução do pH e avaliado o crescimento celular pela massa seca e absorbância.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 - 05459 - Pinheiros
SÃO PAULO - BRASIL

1. INTRODUÇÃO

Alguns tipos de despejos industriais, tais como os de usinas de açúcar e álcool, de gêneros alimentícios, de destilarias, etc... constituem, no presente, um dos assuntos mais preocupantes, face à necessidade existente da preservação do meio ambiente. Esses efluentes apresentam elevados teores de matéria orgânica, são bastante volumosos e considerados os despejos mais difíceis de serem tratados.

O sistema de recuperação baseado em bactérias fotossintéticas, desenvolvido recentemente no Japão, oferece ótima perspectiva para solução dos problemas ecológicos, bem como para o aproveitamento de matérias orgânicas residuárias como fonte de proteína.

Embora, até recentemente, não tenham recebido atenção especial no campo do saneamento ambiental, as bactérias fotossintéticas proliferam abundantemente em condições naturais e desempenham função importante na purificação dos corpos de água poluída. Dentre as várias fases biológicas dos processos naturais de estabilização, as bactérias fotossintéticas aparecem de forma predominante na segunda, precedidas pelas bactérias heterotróficas. Nesse estágio, a concentração de matéria orgânica é ainda da bastante elevada, porém as águas residuárias já sofrem certo grau de estabilização. Após esta fase, o processo de purificação natural prossegue através da intensa proliferação de microalgas.

Analogamente ao que se verifica nas plantas clorofiladas, as bactérias fotossintéticas realizam ação fotossintética através de pigmentos (bacterioclorofila e/ ou carotenóides) contidos nas células bacterianas, utili

zando-se da energia luminosa. Entretanto, diferindo das plantas, esses microrganismos, principalmente aqueles pertencentes à família ATHIORODACEAE, utilizam de forma acelerada substâncias orgânicas, preferencialmente ácidos graxos, além de elementos inorgânicos.

Além dessa notável eficiência de tratabilidade, deve-se ressaltar que as bactérias fotossintéticas contêm elevadas concentrações de componentes nutritivos. O conteúdo proteíco desses microrganismos chega próximo de 60% e a sua composição em aminoácidos é superior à da CHLORELLA e do levedo de cerveja. Os teores de vitaminas são comparáveis com os do levedo de cerveja. Portanto, as bactérias fotossintéticas produzidas no sistema de tratamento de efluentes concentrados em matéria orgânica isentos de substâncias tóxicas, como por exemplo o vinhoto, podem ser aproveitadas como excelente ração animal. Vale acrescentar que as bactérias fotossintéticas, são capazes de utilizar várias substâncias tóxicas encontradas em águas poluídas e matérias putrefeitas, tais como cadaverina, cianetos, putrescina, H_2S, etc.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As bactérias fotossintéticas são organismos tipicamente aquáticos e podem ser subdivididos em três grandes grupos: ATHIORODACEAE (vermelhas e não acumulam enxofre), THIORODACEAE (vermelhas e acumulam enxofre), e CHLOROBACTERIACEAE (verdes e acumulam enxofre).

Segundo Pfenning[1], que estudou detalhadamente a fisiologia e ecologia das bactérias fotossintéticas sob condições anaeróbias na natureza, a matéria orgânica é fermentada por vários microrganismos heterotróficos, que formam produtos finais reduzidos, H_2, ácidos acético, propiônico e butírico, etanol, aminas, etc...Uma parte destes compostos é utilizada pelas bactérias do nitrato e sulfato. Entretanto, a maior parte desses produtos é utilizada por bactérias metanogênicas e fotossintéticas sendo que estas são mais eficientes que as metanogênicas,pois obtém sua energia através da luz, pela fotofosforilação. As bactérias fotossintéticas possuem 3 características adicionais que contribuem para essa maior eficiência[2]:

1. *Sua habilidade em viver fotoautotroficamente em substratos inorgânicos;*

2. *A grande variedade de substratos orgânicos nos quais elas vivem fotoheterotroficamente;*

3. *A habilidade em transformar compostos orgânicos, inteiramente em substrato celular.*

São considerados como um dos mais versáteis procariontes conhecidos,pelo fato de terem, pelo menos, 5 modos diferentes de vida[3].

Baseadas nessas considerações, foram desenvolvidos, especialmente no Japão, sistemas de tratamento de águas residuárias com elevada carga orgânica. Cerca de 130 estações encontram-se hoje instaladas nesse país, tratando com extraordinária eficiência diversos tipos de despejos concentrados de natureza orgânica.

Crofts (1971) discutiu a utilização potencial de bactérias fotossintéticas na reciclagem de resíduos humanos. Ele propôs 2 sistemas nos quais resíduos fermentados seriam convertidos em biomassa pela fotossíntese bacteriana. O primeiro sistema proposto constaria de um digestor anaeróbico para fermentação, seguido de um tanque de sedimentação. O efluente desse alimentaria um reator fotossintético anaeróbico, onde os produtos finais de fermentação seriam convertidos em biomassa bacteriana e o lodo do tanque de sedimentação poderia retornar para o digestor. As bactérias seriam então coletadas do efluente e o sobrenadante passaria a um reator aeróbio com algas.

O outro sistema seria formado por um fermentador anaeróbico e um digestor fotossintético anaeróbico seguido de um sistema de eletrólise agindo como gerador de oxigênio, pois, segundo ele, a maior inconveniência desse tipo de tratamento é a não produção de oxigênio. Os gases produzidos pelo sistema poderiam passar através de um separador, onde o vapor de água e o CO_2 seriam removidos dos outros gases. A água poderia ser eletrolizada e o oxigênio regenerado. O CO_2 e o H_2 poderiam alimentar o reator fotossintético anaeróbico onde seriam transformados em biomassa[2].

Kobayashi (1971) desenvolveu uma planta piloto que tratava esgoto com mais de 10.000 mg/ℓ de DBO sem nenhuma diluição em uma semana. Essa planta tinha capa

cidade média diária de 7,5 m^3 e máxima de 10 m^3. A piloto constava basicamente de 4 etapas: pré-tratamento e aeração do efluente, tratamento com bactérias fotossintéticas, tratamento com CHLORELLA e utilização do efluente para criação de peixes[4].

Baseado nessas experiências, Kobayashi (1973) descreveu um outro sistema para tratar tanto efluentes domésticos como industriais com altas cargas. O método utilizado foi considerado vantajoso por não produzir lodo e pela utilização dos subprodutos do tratamento (bactérias fotossintéticas e algas) como ração animal e como fertilizante. O sistema era constituído por 3 etapas: tanque receptor, tanque de bactérias fotossintéticas e tanque de cultura de algas[5].

Além da utilização de bactérias fotossintéticas nos sistemas de tratamento já mencionados anteriormente, Kobayashi (1975) investigou a utilização dessas bactérias como alimento de animais e como fertilizante. Segundo o autor, elas não somente são adequadas a essas finalidades como também aumentam a sobrevivência de peixes, a produção de ovos de galinha e melhoram a qualidade e quantidade de frutas cítricas quando utilizadas como fertilizantes[6].

Com o objetivo de verificar a viabilidade desse sistema de tratamento, Toerin et alii (1981) efetuaram estudos preliminares com efluente de curral (DQO 25.920 mg/ℓ) em pequena escala, tanto em condições de laboratório como em condições externas, obtendo remoção de DQO de mais de 90%. O sistema experimental era constituído por 3 unidades: unidade de fermentação, unidade de fotossintética e unidade de algas[7].

O elevado conteúdo protéico das células de bactérias

fotossintéticas, sua composição em aminoácidos essenciais e sua riqueza em vitaminas, levaram Kobayashi et al (1978) a efetuarem estudos sobre a produção de biomassa de Rhodopseudomonas capsulata, concomitante ao processo de tratamento de efluentes de indústrias alimentícias. Através dos resultados obtidos, ele concluiu que a produção de biomassa de fotossintéticas é um processo economicamente viável e que futuramente sua industrialização poderá ser de grande valor como fonte de produção de proteína celular[8].

Sasaki et alii (1981) reforçaram a idéia de Kobayashi, efetuando estudos sobre o potencial dessas bactérias no tratamento de águas residuárias, verificando a produção celular e o conteúdo protéico da biomassa produzida sob condições aeróbicas no escuro. A taxa de crescimento específico máximo (μ) foi 0,19 h^{-1}; a biomassa máxima produzida foi 9,3 g cel/ℓ e a remoção de DQO foi 81% após 40 h para uma cultura de R. gelatinosa[9].

Kobayashi(1975) investigou a capacidade das bactérias fotossintéticas em remover substâncias tóxicas contidas nas águas mal cheirosas, tais como putrescina, cadaverina e sulfeto de hidrogênio[6].

3. ENSAIO COM CULTURA MISTA DE BACTÉRIAS FOTOSSINTETICAS E HETEROTROFICAS EM MEIO SINTÉTICO

Há vários anos a CETESB vem estudando sistemas não convencionais de tratamento biológico e desde 1982 pesquisa sobre bactérias fotossintéticas.

Para se obter o isolamento dessas bactérias na natureza, várias técnicas e meios de cultura foram testados. Atualmente, com o domínio da técnica, mantemos grandes volumes de cultura predominante em bactérias fotossintéticas em nossos laboratórios, rompendo, desta forma, a dependência de inóculo importado e limitação de volume para a realização de experimentos.

Para a resolução dos problemas operacionais e otimização do processo, estão sendo realizados ensaios em escala de laboratório, em diferentes condições, com a finalidade de investigar os mecanismos de interação entre as bactérias fotossintéticas e outras, acondicionamento adequado dos despejos a serem tratados e obtenção de parâmetros de projeto e de operação, em escala piloto, objetivando a produção concomitante de fertilizante e ração animal.

O trabalho apresentado a seguir teve por objetivo a definição da metodologia e das técnicas para o acompanhamento de ensaios com bactérias fotossintéticas aplicada ao tratamento de efluentes, além do envolvimento dos diferentes tipos de microrganismos no processo.

3.1. Materiais e Métodos

Na realização do presente ensaio, o desenvolvimento de uma cultura mista de microrganismos cultivada em meio sintético foi acompanhado através da contagem de microrganismos heterotróficos e fotossintéticos presentes, da concentração celular determinada pela massa seca, medidas de densidade óptica da cultura e da variação do pH.

Para tanto, uma porção de 100 mℓ de uma cultura mista de bactérias fotossintéticas e heterotróficas, obtida através do enriquecimento do sedimento de um córrego, foi transferida para um erlenmeyer contendo 900 mℓ de meio de cultura sintético. O frasco foi incubado sob agitação, iluminação constante, atmosfera de nitrogênio e temperatura constante de 28°C durante 23 dias.

Contagens de bactérias fotossintéticas e heterotróficas, determinações de massa seca, absorbância e pH foram efetuadas ao longo do período de incubação em intervalos de tempo previamente estabelecidos.

A técnica de contagem de bactérias fotossintéticas por nós utilizada foi baseada na técnica do tubo anaeróbio (roll-tube) descrita por Hungate[10] e modificada por Bryant[11]. A contagem foi efetuada pela transferência de uma quantidade determinada da diluição decimal adequada da amostra para um tubo de ensaio contendo 5 mℓ de meio de cultura apropriado com 2% de ágar fundido, sob atmosfera anaeróbica de N_2, e posteriormente vedado com rolha de borracha. Após inoculados, os tubos foram homogeneizados e colocados horizontalmente num aparelho que os submetia a elevadas rota

ções sob um fluxo de água fria até a solidificação do ágar. A força centrífuga distribui o meio de cultura de forma homogênea ao longo da parede interna do tubo. Os tubos foram incubados à temperatura de 28°C em posição vertical, sob iluminação, durante 15 dias. As contagens foram efetuadas em estereomicroscópio sendo computadas todas as colônias vermelhas.

A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada segundo a 14ª edição do "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater"[12].

As medidas de absorbância foram efetuadas num espectrofotômetro Parker-Helmer em uma cubeta de 1 cm de caminho óptico a 550 nm. Três leituras consecutivas da amostra foram realizadas para cada ponto.

Para a determinação da massa seca, 20 mℓ da amostra foram passados através de uma membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μ, previamente pesada. Após a filtração, a membrana era colocada durante 2 horas, no mínimo, numa estufa a 105°C e pesada novamente.

O meio de cultura utilizado foi:

$NH_4Cℓ$	1,0 g
K_2HPO_4	0,2 g
$H_3C\text{-}COONa$	2,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 g
Extrato de Levedura	0,1 g
$NaCℓ$	1,0 g
Peptona	2,0 g
Solução Mineral	10 mℓ
Água Destilada q.s.p.	1000 mℓ

Após autoclavagem foi adicionada 20 mℓ de uma solução a 5% de $NaHCO_3$.

A solução mineral utilizada foi:

$FeCl_3.6H_2O$	5,00 mg
$CuSO_4.5H_2O$	0,05 mg
H_3BO_3	1,0 mg
$MnCl_2.4H_2O$	0,05 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	1,0 mg
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,5 mg
Água Destilada	q.s.p.1000 mℓ

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no ensaio com cultura mista de bactérias fotossintéticas e heterotróficas em meio sintético, estão apresentados na tabela 1.

A figura 1 mostra a evolução da cultura bacteriana através da enumeração das bactérias fotossintéticas e heterotróficas. A figura 2 mostra a variação da concentração celular determinada pela massa seca. As figuras 3 e 4 representam, respectivamente, a densidade óptica da cultura (a 550 nm) e a variação do pH ao longo do tempo.

Tabela 1 - Resultados obtidos no ensaio com cultura mista em meio sintético

TEMPO (dias)	MASSA SECA (g/ℓ)	pH	ABSORDÂNCIA A 550nm	CONTAGEM DE BACTÉRIAS (bact/mℓ)	
				FOTOSSINTÉTICAS	HETEROTRÓFICAS
0	0,08	6,2	0,347	< 1000	$3,7 \times 10^6$
1	0,31	7,0	0,637	$1,66 \times 10^3$	$7,9 \times 10^7$
2	0,44	6,8	0,910	$5,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^8$
3	-	7,0	0,909	$1,24 \times 10^4$	$4,8 \times 10^8$
4	0,55	7,0	0,892	$2,27 \times 10^5$	$1,3 \times 10^9$
5	0,63	7,4	0,858	$1,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^9$
6	-	7,0	0,893	$8,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^9$
7	0,82	7,6	0,932	-	-
8	0,93	7,6	1,017	-	-
9	-	7,8	1,235	-	-
12	1,19	-	-	$1,25 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$
13	-	-	-	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$
14	-	-	-	$1,35 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$
20	1,25	-	-	-	-
23	1,0	8,2	-	$< 10^7$	$3,6 \times 10^8$

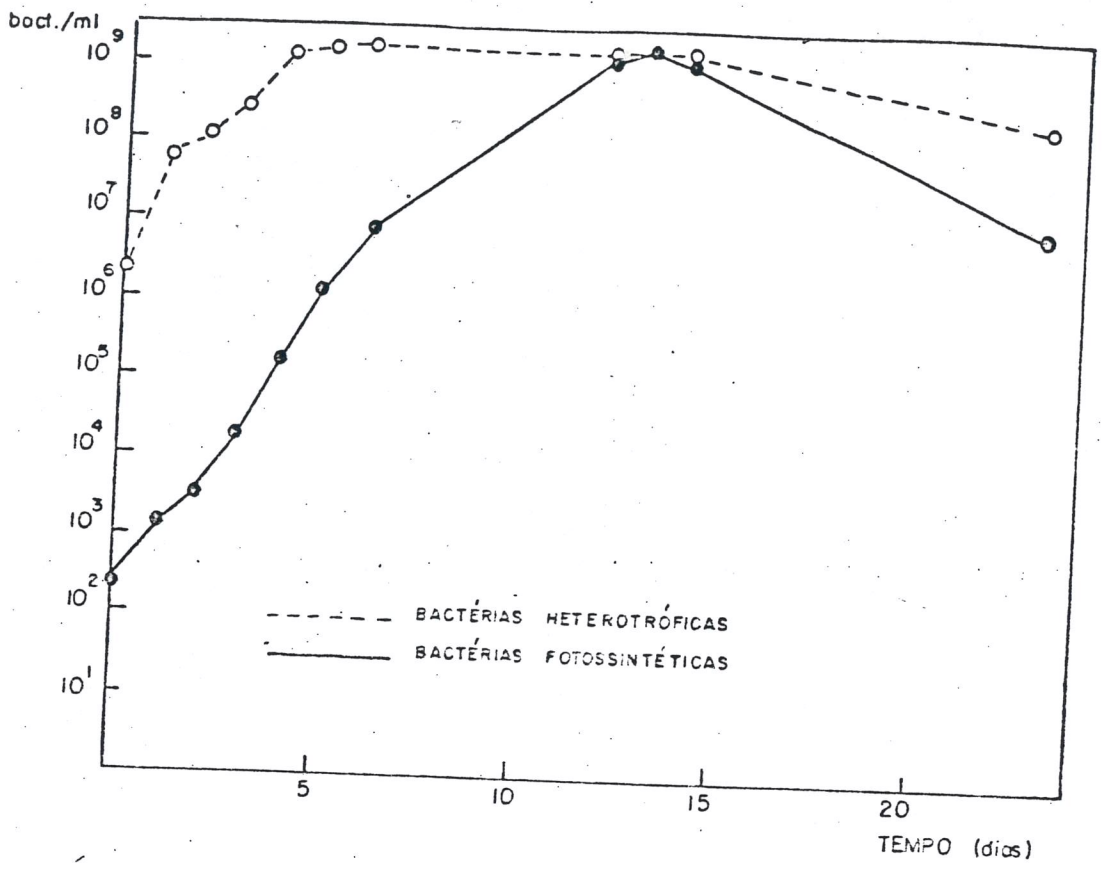

FIG. 1 - Contagem de Bactérias Fotossintéticas e Heterotróficas.

OBS. O trecho entre 0 e 1 dia de crescimento das bactérias fotossintéticas foi determinado por extrapolação através da reta média do crescimento no período 1 a 12 dias.

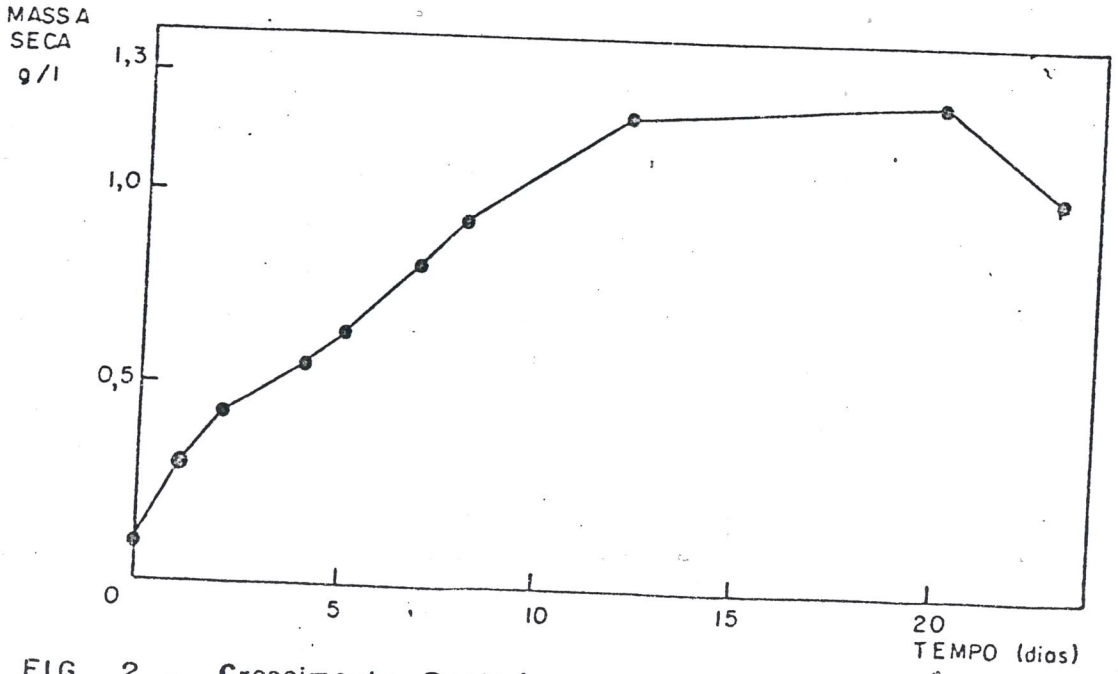

FIG. 2 - Crescimento Bacteriano.

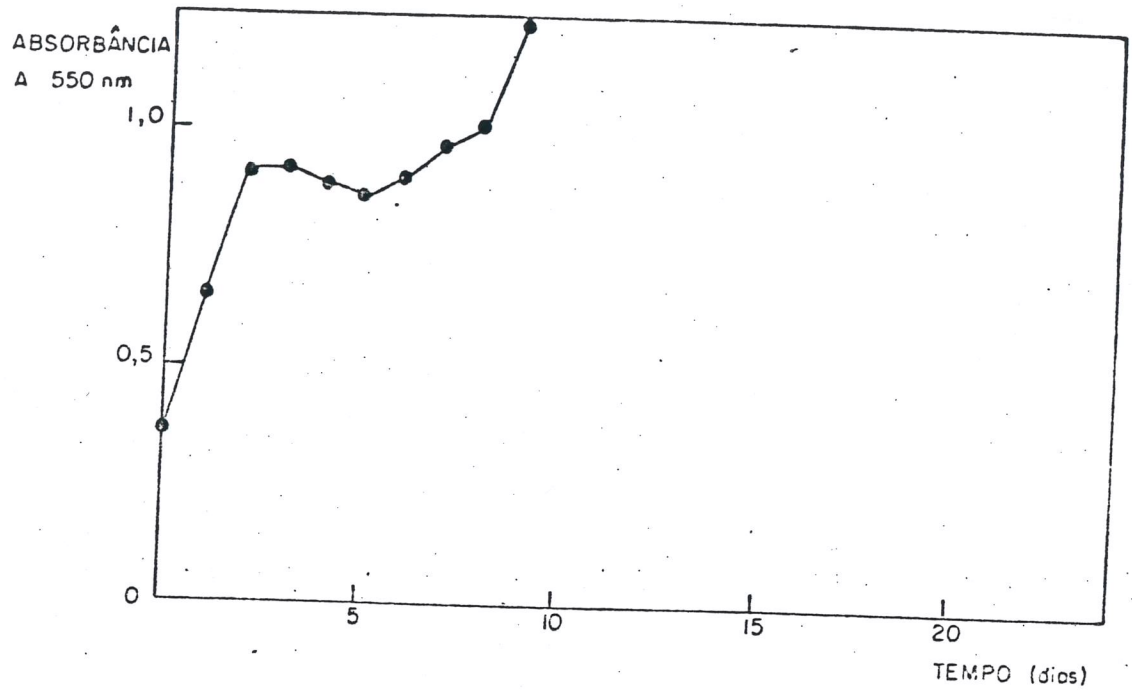

FIG. 3 - Densidade Óptica da Cultura a 550 nm

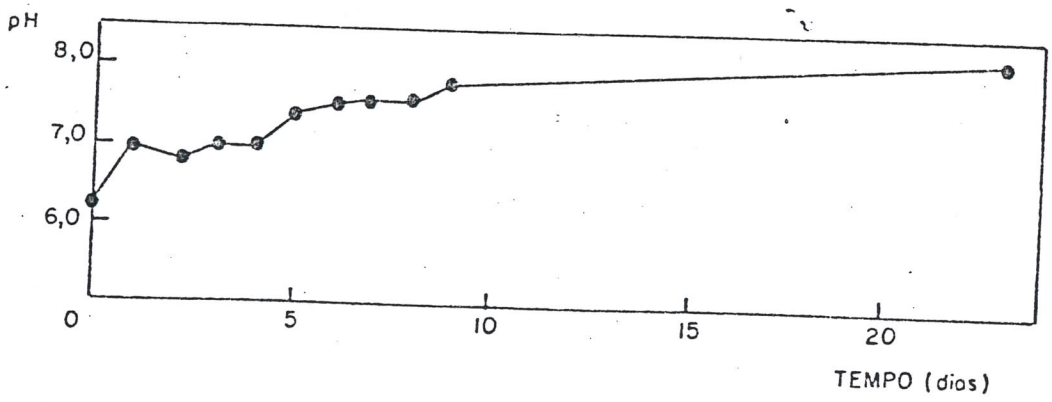

FIG. 4 Variação do pH ao Longo do Tempo.

Com base nos resultados obtidos verificou-se que:

a) O inóculo utilizado continha uma quantidade maior de bactérias heterotróficas do que de fotossintéticas.

b) A taxa de crescimento de bactérias fotossintéticas e heterotróficas na fase de crescimento exponencial foi comparável e ambas atingiram o crescimento máximo na concentração de 10^9 bact/mℓ.

c) O crescimento das bactérias fotossintéticas foi nitidamente maior do que o das heterotróficas, passando de 10^3 bact/mℓ atingido em 1 dia, para 10^9 bact/mℓ em no máximo de 12 dias de ensaio.

d) Na curva de contagens de bactérias (figura 1) aparecem nitidamente 3 fases de crescimento, ou seja, fase exponencial, fase de crescimento máximo estacionário, fase de mortalidade.

e) A curva de crescimento bacteriano expressa pelas determinações de massa seca (figura 2) acompanhou de perto a curva das contagens de bactérias fotossintéticas em todas as fases de crescimento verificadas.

f) A absorbância acompanha o crescimento celular, sobretudo na fase de crescimento exponencial, antes que tenha sido atingida uma concentração celular elevada (figura 3).

g) O pH variou dentro de 3 fases distintas. A primeira foi a da fase ácida até se atingir a neutralidade, patamar no nível de pH=7 e finalmente a fase alcalina, iniciada após o sexto dia até o fi

nal do experimento (figura 4).

A constatação de que o inóculo continha maior número de microrganismos heterotróficos do que fotossintéticos indicou que o inóculo utilizado se encontrava na fase de crescimento exponencial ou de mortalidade, conforme pode ser observado nas curvas de crescimento obtidas pela contagem de microrganismos fotossintéticos e heterotróficos.

A determinação da massa seca quando comparada à curva de contagens, apesar de incluir todo o material intracelular depositado e as células mortas não autolizadas, demonstrou ser, nesse caso, um bom índice de crescimento de bactérias fotossintéticas. Através dessa correspondência, verificou-se que a autólise celular ocorreu rapidamente nas condições do ensaio.

Quanto ao pH, a elevação inicial provavelmente ocorre pelo consumo de ácidos voláteis pelas bactérias fotossintéticas. A fase alcalina provavelmente ocorre pela formação de substâncias básicas originadas pela deminação das proteínas liberadas pela morte celular e pelo consumo adicional de ácidos orgânicos.

Pode-se verificar pelas curvas obtidas que os dados de contagens de bactérias ao longo do tempo se distribuíram de forma muito mais regular do que habitualmente, graças à aperfeiçoada técnica por nós utilizada.

Deve-se observar que em outros trabalhos por nós realizados com vinhaça, após fermentação ácida anaeróbica, foram obtidos resultados similares quanto ao pH e massa seca. A concentração celular máxima (1,04 g/ℓ)

foi atingida em 14 dias e foram observadas as três fases de pH ao longo do experimento. Além disso, foi observado que na fase ácida houve uma diminuição da concentração de ácidos voláteis devido à ação das bactérias fotossintéticas. Na fase alcalina houve um aumento na concentração dos ácidos voláteis, particularmente do ácido acético, pela predominância da ação das bactérias heterotróficas. Apesar da produção de ácidos, o pH manteve-se elevado, possivelmente devido à hidrólise dos acetatos de base forte. Ainda com relação aos ensaios realizados com vinhaça, foi observado que a regularidade da evolução dos parâmetros investigados ao longo do tempo foi menor do que no presente trabalho, conduzido com técnicas de contagem de microrganismos aperfeiçoadas, o que demonstra o acerto da escolha dessas técnicas[13].

5. CONCLUSÕES

O estudo sobre comportamento biológico, efetuado com bactérias fotossintéticas em cultura mista, trouxe substancial contribuição para as pesquisas que estão sendo realizadas no campo de tratamento de resíduos líquidos industriais, utilizando essas bactérias.

A técnica da massa seca, utilizada nesse estudo, apresentou resultados altamente satisfatórios para a avaliação do crescimento de bactérias fotossintéticas, podendo, neste caso, substituir a sofisticada técnica da contagem de bactérias.

6. BIBLIOGRAFIA

1. PFENNING, N. (1976) - Photosynthetic bacteria. Rev. Microbiol. 21: 285-324.

2. CROFTS, A.R. (1971) - The potential of bacterial photosynthesis in recycling of human wastes - Proc. R. Soc. Lond. B. 179 : 209-219.

3. MADIGAN, M.T. et al. (1979) - Growth of the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas capsulata chemoautotrophically in darkness with H_2 as the energy source. Journal of Bacteriology. 137: 524-530.

4. KOBAYASHI, M. et alii (1971) - Construction of a purification plant for polluted water using photosynthetic bacteria. J. Ferment. Technol. 49 (9): 817-825.

5. KOBAYASHI, M.; TCHAN, Y.T. (1973) - Treatment of industrial waste solutions and production of useful by-products using a photosynthetic bacterial method. Water Research. Pergamon Press. 7 : 1219-1224. Great Britain.

6. KOBAYASHI, M. (1975) - Role of photosynthetic bacteria in foul water purification. Progress in Water Purification. 7(2): 309-315. Great Britain.

7. TOERIEN, D.F. et alii (1982) - Stabilizing high-strength wastes with photosynthetic bacteria. Water S.A. 8 (2): 92-96.

8. KOBAYASHI, M. et alii (1978) - Treatment and re-use of industrial waste water by phototrophic bacteria. Progr. Wat. Tech. 11 (1/2): 279-284. Great Britain.

9. SASAKI, K. et alii (1981) - Single cell protein production by treatment of soybean wastes with Rhodopseudomonas gelatinosa. J. Ferment. Technol. 59 (6): 471-477.

10. HUNGATE, R.E. (1969) - A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology. New York, Academic Press, v. 38 - p. 117-132.

11. BRYANT, M.P. (1972) - Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. The American Journal of Clinical Nutrition, 25: 1324-1328.

12. "Standard Methods for the examination of Water and Wastewater", 14ª ed. 1975. APHA-AWWA-WPCF.

13. GRIECO, V.M.; MONTEIRO, I.S.L.; KAWAI, H.; FIGUEIREDO, M.G. (1984) - Utilização de bactérias fotossintéticas no tratamento de efluentes industriais com elevadas cargas orgânicas. CETESB (não publicado)

Data Aquis.: 12-2-86
Indic.: doação
Livraria:
Preço: Cr$ 1,00
Data Tomba: 12-2-86