



## II-145 - ISOLAMENTO E CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS FILAMENTOSAS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ESCUMA FORMADA NO DECANTADOR DE UM REATOR UASB TRATANDO ESGOTO DOMÉSTICO

**Graziella Patrício Pereira Neto**<sup>(1)</sup>

Bióloga pelo Unicentro Metodista Izabela Hendrix. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos na Escola de Engenharia da UFMG.

**Ana Maria Moreira Batista**<sup>(2)</sup>

Bióloga pelo Unicentro Metodista Izabela Hendrix. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos na Escola de Engenharia da UFMG.

**Fernando Antônio Jardim**<sup>(3)</sup>

Biólogo pelo Unicentro Metodista Izabela Hendrix. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Escola de Engenharia da UFMG. Doutor em Botânica pelo ICB/UFMG. Biólogo coordenador do setor de Biologia da Copasa.

**Silvana de Queiroz Silva**<sup>(4)</sup>

Bióloga pela Universidade Federal de São Carlos, Mestre em Hidráulica e Saneamento pela USP São Carlos, Doutora em Microbiologia pela University of Essex, Inglaterra, Pós-doutoranda do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP.

**Roberto Meireles Glória**<sup>(5)</sup>

Engenheiro Ambiental pela Universidade FUMEC. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos na Escola de Engenharia da UFMG.

**Endereço**<sup>(1)</sup> : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Av. do Contorno, nº. 842 - 7º. andar - Centro - Belo Horizonte - MG - CEP: 30110-060 - Brasil - Tel: (31) 3409-1050 - e-mail: [graziella.patricio@gmail.com](mailto:graziella.patricio@gmail.com)

### RESUMO

Dentre os sistemas de tratamento anaeróbio de esgoto, o reator UASB tem atendido as principais vantagens quanto ao baixo custo de implantação e operação. Neste reator, a digestão anaeróbia da matéria orgânica compreende um sistema ecológico que envolve ampla diversidade de microrganismos, principalmente bactérias e arqueias. Na superfície do decantador, é formada uma camada de espuma que agrega microrganismos provenientes do reator, que se adaptaram as condições microaerófilas do meio, e microrganismos oportunistas tais como, microalgas e cianobactérias. A hipótese do presente estudo é que esses microrganismos presentes no decantador, contribuem para oxigenação da espuma. Diante disso, o principal objetivo foi o de identificar os gêneros de cianobactérias presentes na camada de espuma do reator UASB, por meio de técnicas de isolamento e cultivo. Foram realizadas 12 coletas durante um ano de monitoramento da espuma para análise qualitativa. Enquanto que, para análise quantitativa foi realizada apenas uma coleta. A concentração de oxigênio dissolvido foi medida na massa líquida do efluente abaixo da espuma e no efluente final. Além dessas análises, também foram realizados dois isolamentos para posterior cultivo das cepas de cianobactérias detectadas na espuma, com dois meios de culturas: ASM1 líquido e ASM1 sólido, respectivamente. Os resultados obtidos indicaram que na espuma continha quatro gêneros de cianobactérias – *Phormidium* sp, *Oscillatoria* sp, *Pseudoanabaena* sp e *Geitlerinema* sp –, e também algas das classes Bacillariophyceae e Euglenophyceae, com a predominância dessa última. Portanto, as técnicas de cultivo se mostraram satisfatórias para o isolamento e identificação das cianobactérias. Ademais, o meio de cultura ASM1 sólido mostrou-se mais eficaz no isolamento desses gêneros do que o meio ASM1 líquido. A medição de oxigênio dissolvido demonstrou que a presença das algas e cianobactérias contribuem satisfatoriamente para a oxigenação da camada de espuma.

**PALAVRAS-CHAVE:** Reator UASB, Espuma, Algas e Cianobactérias.

### INTRODUÇÃO

O reator de manta de lodo ou UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) é uma tecnologia anaeróbia que tem sido amplamente utilizada para o tratamento de esgotos domésticos. Este processo baseia-se na capacidade dos microrganismos utilizarem os compostos orgânicos biodegradáveis presentes nos esgotos domésticos,



transformando-os em subprodutos. Um desses subprodutos é a camada de espuma formada na superfície do decantador do reator UASB, composta por materiais com densidade menor que da água, nos quais juntamente com microrganismos filamentosos formam uma trama que serve de habitat para outros microrganismos, tais como; algas, bactérias e protozoários.

A presença de espuma em reatores UASB é condicionada à implantação de retentores de espuma que podem ser incorporadas no projeto do reator. Na presença destes, a espuma dispõe-se em camada sólida na superfície do decantador enquanto que, na ausência dos retentores, a espuma apresenta-se de forma fragmentada, sendo diluída no efluente do tratamento anaeróbio. A espuma é constituída por substâncias e materiais de difícil degradação tais como gorduras, óleos e graxas, ceras, sabões, restos de comida, papel e algodão, cabelos, pontas de cigarros, partículas de areia e materiais similares (SOUZA, 2006). No aspecto microbiológico da espuma, os microrganismos presentes toleram as condições existentes neste meio, o que sugere a participação destes na degradação destes compostos.

O papel desempenhado pelos microrganismos em lodos de reatores biológicos é de fundamental importância na degradação da matéria orgânica e de outros compostos presentes nos esgotos. Porém não se sabe o papel dos microrganismos que permanecem associados à espuma. Especula-se que algas e cianobactérias presentes na espuma estejam envolvidas na produção de oxigênio pela fotossíntese, o que torna a camada de espuma favorável ao desenvolvimento de microrganismos aeróbios ou microaerofílicos adaptados às condições encontradas na superfície do decantador do reator anaeróbio. Por sua vez, alguns gêneros de cianobactérias também são capazes de realizar fotossíntese anoxigênica na presença de sulfeto. As espécies de *Oscillatoria* são conhecidas por habitarem em ambientes anaeróbios e são capazes de crescer no escuro via a respiração do enxofre, onde o enxofre elementar é produzido como um intermediário da fotossíntese anoxigênica (STAL, 1995).

A incidência de luz no decantador e os nutrientes provenientes da digestão anaeróbia no reator são fatores que contribuem para o crescimento de algas e cianobactérias com ampla diversidade morfológica e fisiológica. Por sua vez, as cianobactérias são unificadas pela habilidade de realizar fotossíntese oxigênica, como das plantas usando água como doador de elétrons, além de possuírem clorofila e pigmentos fotossintéticos. Além disso, muitas espécies de cianobactérias filamentosas são capazes de fixar nitrogênio molecular diretamente da atmosfera (gêneros heterocitados), o que as torna mais independentes do limitado fornecimento de nitrogênio combinado, além de serem conhecidas por ocorrerem em ambientes anóxicos (STAL, 1995).

O principal significado sanitário das cianobactérias no tratamento de água e esgotos domésticos é atribuído ao fato de algumas linhagens serem potenciais produtores de cianotoxinas (neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas). Há espécies de cianobactérias que liberam essas cianotoxinas – endotoxinas – após a lise celular e outras que são capazes de liberá-las – exotoxinas – durante seu metabolismo. Ademais, algumas espécies pertencentes aos gêneros *Oscillatoria* e *Phormidium* podem formar limo e provocar a corrosão do concreto e do ferro, respectivamente, diminuindo a vida útil das paredes e tubulações do reator (BRANCO, 1986).

Portanto, o objetivo principal desse estudo foi identificar os gêneros de cianobactérias presentes na camada de espuma do reator UASB, por meio de técnicas de isolamento e cultivo. Dessa forma, o isolamento e cultivo das cianobactérias foi um passo importante para um melhor conhecimento dos gêneros e de suas potencialidades fisiológicas, além de ser fundamental para realização de futuros testes de tratabilidade e toxicidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foi utilizado um reator UASB, em escala piloto, destinado ao tratamento de esgotos domésticos. O reator era equipado com retentor de espuma, o que possibilitava a acumulação desta na superfície do decantador. O aparato experimental (Figura 1) foi instalado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG/COPASA. A amostra de espuma e efluente foi coletada no decantador do reator UASB e encaminhada ao laboratório para prosseguimento das análises.

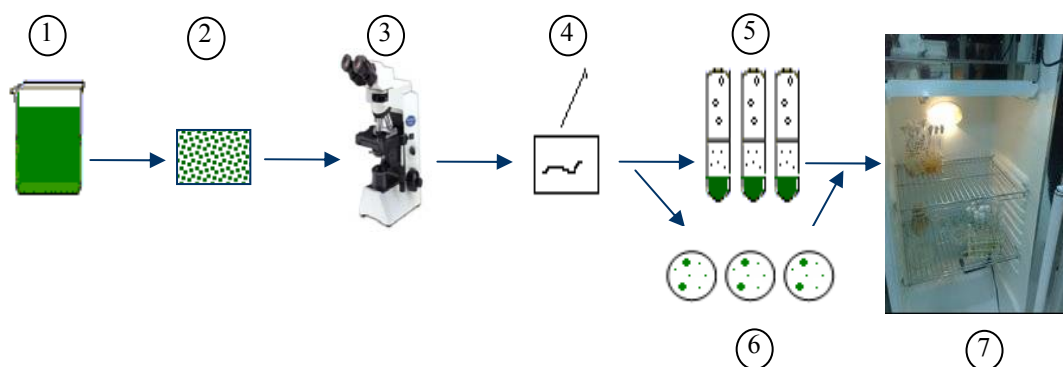


**Figura 1: Vista do reator UASB e decantador ampliado à direita.**

Para identificação e quantificação das algas e das cianobactérias foi coletada toda a espuma do reator UASB (18mL), em frasco de polietileno, mantido resfriado durante o transporte até o laboratório. O volume inicial de espuma foi completado para 1 litro com tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  120mM pH 8,0) e 1mL de lugol foi acrescentado para fixação da amostra. A diluição da espuma foi importante para a separação dos filamentos que formavam um emaranhado constituído principalmente por fios de cabelo, no qual a presença destes dificultava a etapa posterior.

A análise quantitativa das algas e das cianobactérias foi realizada por meio da contagem em câmaras de Sedgwick-Rafter segundo APHA (2005), em microscópio binocular da marca Olympus, modelo BX-50. Previamente, nesse mesmo equipamento, foi feita a identificação das cianobactérias presentes nas amostras de espuma de acordo com ANAGNOSTIDIS e KOMÁREK (1988), KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS (1989, 1999 e 2005), SANT'ANNA e AZEVEDO (1989 e 2000) e AZEVEDO e SANT'ANNA (2003), BICUDO e MENEZES (2006). Coletas mensais foram realizadas durante o período de um ano (14/08/07 a 18/08/08), para verificar a ocorrência de sucessão dos grupos microbianos presentes na espuma.

Para o cultivo das cepas de cianobactérias utilizou-se o meio de cultura ASM1 líquido segundo Cetesb (1993) e os tubos foram mantidos, após o inóculo, em estufa incubadora a  $22 \pm 1$  °C, luminosidade contínua de 40  $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para o isolamento das cepas de cianobactérias foram utilizados dois meios de cultura: ASM1 líquido e ASM1 sólido (GOMES, 2008). Na Figura 2, encontra-se apresentado o esquema das etapas de isolamento para o cultivo das cepas de cianobactérias.



**Figura 2: Etapas de isolamento para cultivo de cianobactérias em meio ASM1 líquido (6) e sólido (7).**

Para o primeiro isolamento das cepas de cianobactérias, alíquota da amostra de espuma (1) foi retirada e em seguida, transferiu-se para lâmina de vidro (2) para posterior observação ao microscópio óptico (3). Um filamento de cianobactéria foi retirado da lâmina com auxílio de uma pipeta de Pasteur (4) devidamente esterilizada, o filamento foi transferido para um tubo contendo meio de cultura ASM1 líquido (5) com nitrogênio (JARDIM, 1999). Os tubos foram mantidos em estufa incubadora (7) durante 15 dias, aclimatada a  $22 \pm 1$  °C com o fotoperíodo 12/12h e luminosidade de 40  $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

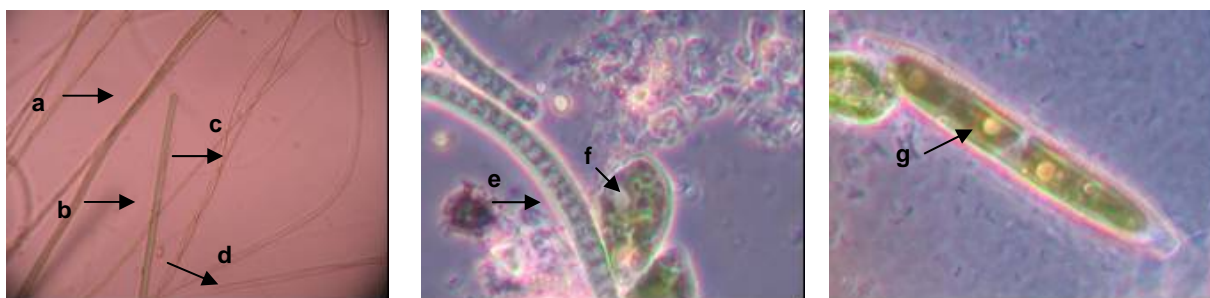
Posteriormente, utilizou-se o método de plaqueamento em meio sólido. Para isto, foi acrescentado ao meio ASM1 líquido, 10% de ágar para cada litro de meio de cultura. O meio sólido (ASM1 + ágar) foi dividido em cubos e transferido para um recipiente contendo água destilada. A cada duas horas, a água destilada era trocada durante três dias, sempre no período da manhã e à tarde, totalizando-se 12 lavagens. Após este procedimento, o meio sólido foi transferido para o Erlenmeyer e esterilizado em calor úmido a 121 °C.

A alíquota do cultivo de cianobactérias, contendo quatro espécies, foi transferida para placa de Petri com meio ASM1 sólido (6). Com o auxílio de uma alça de Drigalski devidamente flambada, os inóculos foram estriados na superfície do meio. As placas foram dispostas na incubadora (7) com a tampa voltada para baixo, a fim de reduzir a possibilidade de contaminação.

Além disso, foram realizados três testes preliminares, para medir a concentração de oxigênio dissolvido na espuma. O teste foi feito na presença e ausência cianobactérias e algas, para avaliar a interferência destes na oxigenação da espuma. O teste foi realizado na massa líquida do efluente imediatamente abaixo da espuma e no efluente final do reator. O equipamento utilizado na medição do oxigênio dissolvido foi o Medidor Multiparâmetros Digital – HQ40d Hach.

## RESULTADOS

O primeiro isolamento das cianobactérias com o meio de cultura ASM1 líquido mostrou-se eficaz para separá-las dos demais microrganismos presentes na espuma, no entanto, análises microscópicas revelaram a presença conjunta de quatro gêneros de cianobactérias mostradas na Figura 3 a, b, c e d. Por conseguinte, o segundo isolamento com o meio de cultura ASM1 sólido possibilitou a seleção de dois gêneros: *Phormidium* e *Pseudoanabaena* sp.



**Figura 3: Microrganismos presentes na espuma - letras a, b, c e d – espécies isoladas e cultivadas; microrganismos observados na análise qualitativa - letras e, f e g.**

a- *Phormidium* sp., b- *Oscillatoria* sp., c- *Pseudoanabaena* sp. e d- *Geitlerinema* sp., (aumento de 200X) e- *Phormidium* sp. f- Euglenophyceae g- Bacillariophyceae (aumento de 1000x).

Apesar do meio ASM1 líquido ter possibilitado a separação das cianobactérias dos demais microrganismos presentes na espuma, o meio ASM1 sólido se mostrou mais eficaz no isolamento das cepas por facilitar a seleção das cianobactérias.

As cepas de *Phormidium* sp, *Oscillatoria* sp, *Pseudoanabaena* sp e *Geitlerinema* sp, foram encontradas na camada de espuma próximas as bactérias de vários morfotipos, isto sugere uma interação e adaptação destes microrganismos às condições ambientais existentes na espuma. Entretanto, também existe a possibilidade de competição entre eles pelos nutrientes disponíveis no efluente, o que pode vir a favorecer a predominância de alguma espécie.

Em relação à análise quantitativa da espuma do reator UASB, os resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1: Resultados da análise quantitativa de algas e cianobactérias.**

ORGANISMOS	ORGANISMOS/ML
Bacillariophyceae	*120,5
Euglenophyceae	13253,0
<i>Phacus sp.</i>	1566,3
<i>Phormidium sp.</i>	*120,5
<i>Oscillatoria sp.</i>	*120,5
<i>Geitlerinema sp.</i>	*120,5
<i>Pseudoanabaena sp.</i>	*120,5

\* Estes valores correspondem às algas e cianobactérias visualizadas na amostra durante a análise qualitativa, mas que não foram observadas na alíquota retirada para contagem (análise quantitativa). Por se tratar da mesma amostra, sabe-se que as algas (*Phormidium sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Pseudoanabaena sp.* e *Geitlerinema sp.* e Bacillariophyceae) estavam presentes, portanto foi adotado o n°org/mL igual a 1 para as mesmas.

Conforme apresentado na Tabela 1, o grupo mais freqüente das algas foi da Ordem Euglenophyceae (Figura 3f) e do gênero *Phacus sp.*

Presume-se que a predominância destas algas na espuma se deve a sua adaptação em ambientes ricos em matéria orgânica. Na análise qualitativa, observou-se durante todo o período de monitoramento, alterações na concentração de diatomáceas (Figura 3g), conforme a estação do ano, sendo mais abundantes na primavera e outono (14/08/07 a 18/08/08). Estes resultados condizem com os previamente relatados na literatura (BRANCO, 1978). Contudo, as alterações na concentração das diatomáceas são mais comuns em ambientes naturais.

Em relação às cianobactérias, a possibilidade de corrosão do concreto e do ferro por espécies pertencentes aos gêneros *Phormidium* (Figura 3e) e *Oscillatoria*, respectivamente, ocorre quando estes microrganismos formam um limo aderente à parede dos reatores. Entretanto, neste estudo, estes microrganismos se aderem aos materiais flutuantes da camada de espuma, minimizando drasticamente seu crescimento nas paredes do reator.

Este estudo não objetivou estudar a potencialidade tóxica das cianobactérias *Phormidium*, *Oscillatoria* e *Geitlerinema sp.* Entretanto, é importante ressaltar que os três gêneros de cianobactérias são potenciais produtores de cianotoxinas. Contudo, o efluente do reator UASB deste estudo não é utilizado para consumo humano e por isso não compromete à saúde pública.

Os gêneros *Geitlerinema sp.* e *Pseudoanabaena sp.* não foram observados durante todo período de monitoramento por meio de microscopia óptica. Contudo, no isolamento com meio ASM1 líquido, estes microrganismos foram observados e se adaptaram as condições de cultivo. Na literatura, estes microrganismos são relatados em sistemas de tratamento de água, mas não há citações quanto à adaptação dos mesmos em ambientes ricos em matéria orgânica.

No que se refere, aos resultados de oxigênio dissolvido foram encontrados valores médios de 0,38 mg/L para o efluente imediatamente abaixo da espuma, na presença dos microrganismos fotossintetizantes, e 0,09 mg/L para o efluente final na ausência de espuma. De acordo com estes resultados preliminares, as concentrações de oxigênio dissolvido foram maiores para a massa líquida imediatamente abaixo da espuma, quando comparados com o efluente final do reator, com retirada da espuma.

Dessa forma, a fotossíntese oxigênica realizada por algas e cianobactérias possibilita a oxigenação do meio, no qual, nestas condições pode estimular o desenvolvimento de microrganismos aeróbios ou microaerofílicos que contribuem para a degradação da matéria orgânica residual ou compostos inorgânicos produzidos durante a digestão anaeróbia.





## CONCLUSÕES/RECOMENDAÇÕES

Com base no trabalho realizado, conclui-se que:

As técnicas de isolamento e cultivo se mostraram satisfatórias para os gêneros de cianobactérias filamentosas, *Phormidium* sp, *Oscillatoria* sp, *Pseudoanabaena* sp e *Geitlerinema* sp. sendo recomendado o uso destas técnicas para espuma do reator UASB.

No caso de não obter sucesso com o isolamento em meio ASM1 líquido, recomenda-se o uso do meio ASM1 sólido.

A medição de oxigênio dissolvido demonstrou que a presença de algas e cianobactérias contribuem para a oxigenação da camada de espuma.

Recomenda-se o uso de microeletrodos de oxigênio de forma a traçar o perfil de oxigênio na camada de espuma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21<sup>a</sup>ed. Washington, APHA/WEF/AWWA, 2005.
2. ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes, Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, v.80, n. 1-4, p.327-472, 1988.
3. AZEVEDO, M.T.P., SANT'ANNA, C.L. *Sphaerocavum*, a new genus of planktic cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. *Algol. Studies*, v.109, p. 79-92, 2003.
4. BICUDO, C.E.M., MENEZES, M. *Gêneros de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)*. 2 ed. RiMa, São Carlos. Brasil, 2006. 502p.
5. BRANCO, S. M. Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária. 2. ed. CETESB, São Paulo, Brasil, 620 p, 1986.
6. CETESB, NT 06: L5. 025. Teste para avaliação de toxicidade aguda de cianobactérias - método de ensaio. São Paulo, 1993.
7. GOMES, L. N. L. *Estudo da associação entre parâmetros bióticos e abióticos e a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Vargem das Flores – MG*. 184f. Tese [Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Escola de Engenharia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
8. JARDIM, F. A. Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA MG. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia – UFMG, Belo Horizonte (1999).
9. KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chlorococcales. – In: ETTL, H., GÄRTNER, G., HEYNING, H., MOLLENHAUER, D. (Ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer, Stuttgart, 1999. p. 545.
10. KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 2. Teil: Oscillatoriales. – In: BÜDEL, B., KRIENITZ, L., GÄRTNER, G., SCHAGERL, M. (Ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer, Stuttgart, 2005. p. 759.
11. KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4. Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, v.82, n. 3, p.247-345, 1989.
12. SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, v.71, p. 359-385, 2000.
13. SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. *Nova Hedwigia*, v.16, p. 89-131, 1989.
14. SOUZA, L. C. *Estudo quantitativo e qualitativo de espuma acumulada em reatores UASB tratando esgotos domésticos*. 130f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
15. STAL, L.J. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytol.*, v. 131, p. 1-32, 1995.