

Método de número mais provável para avaliação de grupos fisiológicos de microrganismos em digestão anaeróbia de água residuária de mandioca

Most probable number method for microorganism physiologic group's evaluation in anaerobic digestion of cassava wastewater

Maria Magdalena Ferreira Ribas¹

Maria Eneida Cunha²

Marney Pascoli Cereda³

Resumo

A avaliação da microbiologia anaeróbia é um método caro e muito difícil. Técnicas simples são disponíveis para avaliação de microrganismos de diversos usos como médico, alimentar, ambiental e sistemas anaeróbios para tratamento de efluentes. Uma metodologia desenvolvida foi usada para avaliar a atividade de grupos de microrganismos em digestão anaeróbia com possível aplicação a substratos específicos. A técnica usa gases isentos de oxigênio em frascos tipo penicilina e fechados com tampa de borracha e selo de alumínio, onde foi adicionado um indicador de redução, complementos nutricionais e agentes redutores após a esterilização. O metabolismo dos microrganismos foi observado nesses frascos fechados depois de um período de incubação de quatorze dias pela variação da turbidez, de pH medido em indicador de Arrhenius e de gás capturado em tubos Duran. A técnica do Número Mais Provável (NMP) foi usada para contagem de microrganismos em meio de cultivo adaptado para grupos específicos de microrganismos que eram esperados para se desenvolver em água residuária de mandioca com amido e seus hidrolisados (dextrina, maltose e glicose) como fonte de energia. Para aferir o método, amostras foram coletadas de um reator acidogênico de mistura completa ligado a um reator metanogênico de leito fixo, ambos alimentados com água residuária de mandioca. O gás capturado nos

1 Dra.; Engenheira Agrônoma; Professora ajunta do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Maringá – UEM; E-mail: m2fribas@yahoo.com.br

2 M.Sc.; Bióloga; E-mail: e12cunha@ig.com.br

3 PhD.; Engenheira Agrônoma; Professora da Universidade Católica Dom Bosco; Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq; E-mail: cereda@ucdb.br

tubos Duran dos frascos de penicilina foi analisado por cromatografia quanto ao conteúdo de metano. O uso dos meios permitiu separar os microrganismos em três grupos usando meio de cultivo seletivo: Meio Mínimo (MM) sem substratos orgânicos, Meio Completo (MC) com uma mistura de amido de mandioca e seus hidrolisados e Meio Diferencial (MD) usando cada derivado de amido isoladamente. O sistema de tratamento anaeróbio no período analisado operou com um bom desempenho e a microbiologia confirmou estes resultados. No efluente do reator acidogênico foi encontrado 10^3 microrganismos/mL no MC e 10^{15} microrganismos/mL no MM e uma contagem máxima de 10^{10} em MC. No efluente do reator metanogênico, foi encontrado 10^9 em MM microrganismos/mL e 10^{10} em MC. Para o MD, os valores foram intermediários para MC e MM em todas as amostras. Para testar a técnica de avaliação da atividade microbiana, uma dose única de choque de 750 mg/L de cianeto (CN^-) foi adicionada ao afluente do reator acidogênico. Depois de 48 horas, foi detectada redução na produção de gás e queda equivalente (10^4) no número de todos os grupos de microrganismos pela entrada do cianeto. A alimentação do reator foi retornada à concentração inicial de água residuária de processamento de mandioca e, depois de quinze dias o reator voltou a apresentar estabilidade. Em decorrência, observou-se aumento de todos os grupos de microrganismos. Portanto, as contagens microbianas obtidas foram condizentes com as condições de funcionamento dos reatores anaeróbios no período avaliado, validando a metodologia proposta.

Palavras-chave: microbiologia anaeróbia; cianeto; digestão anaeróbia; NMP.

Abstract

Anaerobic microbiology evaluation is an expensive and very difficult method. Simple techniques are available for the assessment of microorganism in several uses, such as medical, food, environment and anaerobic systems for wastewater treatment. A methodology was developed to assess the activity of microorganisms groups in anaerobic digestion with possible application to specific substrata. The technique applies oxygen-free gases in serum bottles closed with a rubber cover and an aluminum seal with the addition of a reducing indicator, nutrient complements and reducing agents after sterilization. The metabolism of the microorganisms was observed in these closed serum bottles after an incubation period of fourteen days, and regarding turbidness variation, pH variation measured by Arrhenius's indicator and gas

captured in Duran tubes. The Most Probable Number (MPN) technique was used for microorganism counting in cultivation media adapted to specific microorganisms groups that were expected to grow in cassava wastewater with starch and its hydrolyzed substances (dextrin, maltose and glucose) as an energy source. In order to checking the method, samples were collected from a complete mix acidogenic reactor linked to an upflow packed bed methanogenesis reactor both feed with cassava wastewater. Gas captured in the Duran tubes from the serum bottles was analyzed by means of chromatography for methane content. The use of media allowed us to separate the microorganisms in three groups using selective cultivation media: Minimum Media (MM) without organic substrates, Complete Media (CM) with a mixture of cassava starch and its hydrolyzed substances and Differential Media (DM) using each isolated starch derivative. The anaerobic treatment system operated with a good performance and the microbiology confirmed these results during the analyzed period. Findings in the acidogenic reactor effluent were 103 microorganisms/mL in CM and 1015 microorganisms/mL in MM, and maximum counts of 1010 in CM. In the methanogenic reactor effluent 109 in MM microorganisms/mL and 1010 in MC were found. For DM the values were intermediate for CM and MM in all samplings. In order to test the technique for microbiological activity assessment, a unique shock concentration of 750 mg/L of cyanide (CN⁻) was added to the acidogenic reactor affluent. After 48 hours, a reduction in gas production and a similar drop (104) in number of all the microorganisms groups were observed. The reactor feeding was returned to the initial concentration of cassava processing wastewater and after 15 days the reactor showed stability. As a consequence, we verified the increase of all microorganisms groups. Therefore, the microbiological counts obtained were consistent with the functioning conditions of the anaerobic reactors during the assessed period, validating the proposed methodology.

Key words: anaerobic microbiology; cyanide; anaerobic digestion; MPN.

Introdução

O termo anaerobiose foi introduzido por Pasteur em 1840 para caracterizar microrganismos que vivem na ausência de oxigênio. Apesar de sua importância, as técnicas de manipulação e contagem de anaeróbios continuam a ser complicadas e caras.

Uma das áreas de aplicação da anaerobiose é o tratamento de resíduos, pelas vantagens que oferece em relação ao tratamento aeróbio. Cereda et al. (1990) citam que várias tentativas foram feitas para compreender melhor a microbiologia da metanogênese, dada a importância que essa tem assumido quando da necessidade de avaliar um

inóculo, otimizar o desempenho de um reator, explicar os sucessos e os insucessos de um sistema ou esclarecer a paralisação súbita de um reator.

Hungate desenvolveu em 1950 técnicas de manipulação de microrganismos anaeróbios usando tubos de ensaio fechados com meios de cultura gelificados com ágar espalhados nas paredes e atmosfera de gás carbônico. O controle da condição redutora era feito pela coloração do indicador resazurina. A técnica clássica do autor para obter gases em condições reduzidas, empregava uma coluna de vidro recheada de aparas de cobre, com a desvantagem de ser frágil e alto custo, apesar de permitir boa visualização das aparas para definir a necessidade de regeneração do cobre pela perda da cor brilhante.

Para contornar essas dificuldades, algumas modificações foram propostas por Cunha (1990), em que foi avaliada uma coluna de tubo de cobre com um segmento em espiral recheado com aparas de cobre com sistema de manutenção de temperatura a 350°C. Por uma das extremidades da coluna entrava gases (CO₂, H₂, N₂ e 80% de CO₂/20% de H₂) e a outra, era ligada à tubulação de borracha, de onde partiam ramificações que terminavam em seringas com agulhas longas para saída de gases reduzidos que eram introduzidos nos frascos com meios de cultura. Um manômetro permitia registro e controle da pressão dos gases no interior dos frascos a uma atmosfera.

Antes do uso da coluna, o autor sugeriu que fosse corrido nitrogênio gasoso (N₂) por cinco minutos para eliminar traços de oxigênio e em seguida

H₂. Concomitantemente, a coluna de cobre deveria ser aquecida até 350°C/20 minutos, para que o oxigênio fosse fixado ao passar pelas aparas de cobre. As dificuldades deste método estavam na manutenção da anaerobiose. Quando os tubos já preparados eram autoclavados, as rolhas se deslocavam ou saltavam e mesmo usando uma prensa para segurá-las o rendimento do preparo era muito baixo, pois muitos tubos acusavam presença de oxigênio (O₂) depois de prontos. Técnicas e equipamentos mais sofisticados melhorariam a eficiência desta metodologia, mas exigiriam materiais e laboratório especializados.

Atualmente, devido à crescente aplicação de microrganismos no saneamento ambiental, a biotecnologia de microrganismos vem se desenvolvendo com o uso de técnicas moleculares como a reação de polimerização em cadeia (PCR), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), o que torna possível a detecção, identificação específica, quantificação, caracterização da estrutura e da distribuição espacial da comunidade microbiana presente em lodos e biofilmes de microrganismos (HIRASAWA, 2003).

Contagens de microrganismos pelo Número Mais Provável (NMP) são técnicas antigas, rápidas e de baixo custo, que permitem avaliar estatisticamente o número dos microrganismos presentes numa amostra e estimar a proporção viável metabolicamente ativa (Jones *apud* Gaj-Levra, 1991). O NMP permite estimar a densidade da população empregando-se diferentes meios de cultivo, analisando-se o crescimento celular microbiano

através da leitura da turvação do meio e determinação de produtos metabólicos no meio, como gases, ácidos e alcoóis (VAZZOLLER, 1995).

A técnica do NMP pode ser utilizada para estimar a população total ou um grupo específico de microrganismos em uma amostra, e o conjunto de respostas positivas ou negativas é considerado para o cálculo estimativo do número de microrganismos desta amostra. Quando o método considera algum aspecto do metabolismo celular, torna-se possível avaliar a quantidade de algum grupo específico de microrganismo (ATLAS e BARTHA, 1981).

Giaj-Levra (1991) cita que o NMP é um método muito simples para quantificar microrganismos anaeróbios, apesar de ser necessário um tempo de incubação e a leitura dos resultados pode exigir exames microscópios e análises cromatográficas de gases para complementação dos mesmos.

Chen (1983) objetivando determinar a concentração de termófilos anaeróbios em um reator mesofílico alimentado com lodo primário municipal e examinar as capacidades de adaptação de várias subpopulações de microrganismos anaeróbios a temperaturas termofílicas retirados de reatores mesofílicos que tratava lodo primário municipal em temperaturas termofílicas, aplicou a técnica do NMP para quantificar os diferentes grupos fisiológicos de microrganismos anaeróbios. O autor observou que apenas 10% da população microbiana mesófila total, contando em número de colônias por mililitro utilizado, era capaz de sobreviver em ambiente termofílico, sendo que 9%

eram termófilos (50° C) e 1% termófilos obrigatórios (60° C).

A própria água residuária, contendo materiais poluentes que se pretende degradar biologicamente, pode ser usada como meio de cultivo de microrganismos. Esta prática seleciona aqueles microrganismos que são capazes de se desenvolver a partir dos compostos presentes no despejo, como é o caso da biorremediação, processo em que os microrganismos são utilizados para eliminação ou detoxificação do ambiente contaminado por xenobióticos (VAZOLLER, 2002).

No Brasil, o cultivo da mandioca é feito para produção de farinha e amido, processos esses que geram água residuária que carrega matéria orgânica biodegradável como açúcares solúveis (40g/L) e linamarina, principal composto cianogênico solúvel em água (CEREDA, 2001). Segundo Conn (1994) quando o tecido vegetal é dilacerado como ocorre na moagem da raiz, ocorre uma reação enzimática sob as condições ótimas de 25° C, pH entre 5,5 e 6,0 (Cereda e Mattos, 1996) liberando o ácido cianídrico que é volátil e tóxico a muitas formas vida.

O processo de digestão anaeróbia da água residuária de processamento de mandioca em duas fases, acidogênica e da metanogênica, constitui-se alternativa de tratamento que além de ser mais estável e eficiente na redução de cianeto total e de carga orgânica, o que foi comprovado por diversas pesquisas realizadas (CEREDA et al., 1986; LACERDA, 1991; BARANA, 2000; RIBAS e CEREDA, 2003). O sistema é composto por um reator na fase acidogênica do tipo mistura completa

e como reator metanogênico um fluxo ascendente com leito fixo. O sistema permite redução da carga orgânica de 40 a 60%, rendimento de biogás de 0,5 a 0,7 L gás por g de carbono orgânico total (COT) destruído com carga orgânica de 8,2 e 4,4 g COT/L.dia e redução de cianeto superior a 77% (RIBAS e CEREDA, 2003).

Barana (2000) avaliou o desempenho do mesmo sistema de reatores e observou remoção da carga orgânica de 51 a 87%, rendimento de biogás de 0,6 a 5,5 L gás por g de demanda química de oxigênio (DQO) destruída com carga orgânica de entrada de 18,4 a 53,5 g DQO/L.dia. A redução de cianeto total foi superior a 67%.

A separação de fases promove condições adequadas para os grupos de microrganismos envolvidos em cada fase. Segundo Ribas e Cereda (2001), a estabilidade é obtida pela neutralização dos ácidos orgânicos gerados durante a acidogênese, mantendo-se o pH da flora natural que é de aproximadamente 4,5, entre 5,5 e 6,0 para favorecer microrganismos acidogênicos.

Com o estabelecimento de sistema adequado de tratamento, é importante conhecer como respondem os microrganismos envolvidos em cada fase para maior controle do sistema. Cereda et al. (1986 e 1990) avaliaram a microbiologia de sistemas anaeróbios em duas fases usando método de NMP em meios específicos para tratamento de suspensões amiláceas de batata.

Neste trabalho, testou-se o aparato experimental proposto inicialmente por Hungate para avaliar metodologia de separação de diferentes grupos

fisiológicos de microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia com separação de fases no tratamento da água residuária de processamento de mandioca e avaliar diferentes meios de cultivo seletivos para cada grupo de microrganismos.

Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista em Botucatu (SP). A água residuária do processamento de mandioca que foi usada como substrato dos reatores foi coletada em uma farinha localizada no município Santa Maria da Serra (SP), Brasil.

Reator acidogênico de mistura completa e reator metanogênico de fluxo ascendente com leito fixo

Amostras dos efluentes dos reatores acidogênicos e metanogênicos foram usadas para avaliar a microbiologia. O reator acidogênico não recebeu nenhum tipo de inóculo e somente se desenvolveram microrganismos naturais do resíduo. O pH da água residuária foi corrigido diariamente para valores próximos de 6,5 com NaOH (hidróxido de sódio) por sete dias (RIBAS e CEREDA, 2003). Após este período, a água residuária praticamente estabilizada foi chamada de substrato e foi diluída em água na proporção de 20 mL/L (0,15 g de sólidos voláteis/L reator/dia) e usado como afluente do reator metanogênico. Já, o reator metanogênico foi inoculado com lodo proveniente de um reator anaeróbio de mistura completa que tratava água residuária de processamento de mandioca

diluída com água na proporção de 70%. O reator era constituído de uma coluna de PVC (cloreto de polivinila) com fluxo ascendente e leito fixo com volume útil de 9,33 L. O leito fixo era composto por anéis de PVC rígido de 5,0 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. A alimentação contínua do substrato era feita na base do reator por bomba peristáltica. A carga orgânica foi estabelecida em 0,15 g de sólidos voláteis/L.dia e o tempo de retenção hidráulica de 4 dias. O reator ficava imerso em sistema termostaticado que manteve a temperatura em 35°C. O gás era coletado na parte superior do reator em gasômetro telescópico com selo de solução salina acidulada e o teor de metano determinado por análise cromatográfica conforme Lacerda (1991).

Método Número Mais Provável

O método foi descrito detalhadamente por Cereda et al. (1986 e 1990) utilizando frascos novos tipo penicilina com capacidade de vinte mL. Antes de serem usados foram lavados e esterilizados a seco. Após o preparo, os frascos receberam meio de cultura em condições reduzidas, fechados com a tampa de borracha e recravadas com selos de alumínio de vinte mm de diâmetro. A seguir, foram processados em similaridade com o método clássico de Hungate (1950), passando os gases em coluna de cobre aquecida por vinte minutos para obter meio suficientemente reduzido Cereda et al. (1986 e 1990).

Meios de cultivo

Foram empregados os meios, citados por Leedle e Hespell (1980)

com algumas modificações, adaptados quanto à composição dos carboidratos e à técnica do número mais provável (Jones e Paynter, 1980). O Meio Completo (MC) foi composto por 0,2 g/100mL carboidratos (compostos de 0,1 g/100mL de amido de mandioca, 0,05 g/100mL de dextrina, 0,025 g/100mL de maltose e 0,025 g/100mL de glicose), 0,2 g/100mL extrato de levedura, 4,0 mL/100mL solução mineral I, 4,0 mL /100mL solução mineral II, 1,0 mL /100mL solução de ácidos graxos voláteis, 0,1mL/100mL solução de resazurina a 0,1%, 40 mL/100mL solução clarificada do efluente, 1,0 g/100mL solução de Na₂S/cisteína (2,5g/100mL /2,5 g/100mL), 5,0 g/100mL solução de Na₂CO₃, 8 g/100mL. O Meio Mínimo (MM) foi preparado do mesmo modo que o completo, eliminando-se, porém, os carboidratos. No Meio Diferencial (MD), foi utilizado como fonte de energia cada um dos carboidratos isoladamente (amido ou seus hidrolisados) na concentração de 0,2 g/100mL.

Preparo das soluções: As soluções adicionadas aos meios foram preparadas da seguinte forma:

- Solução mineral I: 0,6 g K₂HPO₄/100 mL de água destilada.

- Solução mineral II: 0,6 g KH₂PO₄, 0,6 g (NH₄)₂SO₄, 1,2 g NaCl, 0,255 g MgSO₄.7H₂O, 0,169 g CaCl₂.2H₂O, em 100 mL de água destilada.

- Solução de ácidos graxos voláteis: 17 mL de ácido acético, 6 mL de ácido propiônico, 5 mL de ácido butírico, 1 mL de ácido iso-butírico, 1 mL de ácido n-valérico, 1 mL de ácido iso-valérico, com pH ajustado a 7,5 com NaOH concentrado e com o volume completado a 100 mL com água destilada.

- Solução clarificada do efluente: obtida após filtração e fervura do sobrenadante por 1 minuto para eliminação dos colóides, seguida de nova filtração em papel de filtro.

- Solução de Na_2S /cisteína: 2,5 g de cisteína ($\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$) diluídas em água destilada, com pH ajustado a 10 com NaOH 3N. Foram acrescentados 2,5 g de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e o volume completado para 200 mL. Em seguida, esta solução foi fervida sob fluxo de N_2 e esterilizada.

- Solução de Na_2CO_3 (8 g/100mL): obtida pela dissolução de 8,0 g de Na_2CO_3 em água destilada. A solução foi esterilizada e após resfriada foi saturada com CO_2 isento de oxigênio por trinta minutos.

- Diluente: foi preparado a partir do efluente final do reator metanogênico diluindo a 10% com água destilada, clarificado por filtração. O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH antes da esterilização. O diluente assim preparado foi distribuído em volumes de 9 mL nos frascos, sob condições reduzidas.

- Manipulação dos meios: uma vez preparados o pH dos meios de cultivo foi ajustado para 7,0 com NaOH . As condições reduzidas foram obtidas por ebulição por poucos minutos, seguida de borbulhamento de CO_2 reduzido. Foram distribuídos 10 mL de meio em cada frasco, que foi então tampado e recravado. As soluções redutoras (Na_2S /cisteína e Na_2CO_3) foram introduzidas assepticamente nos frascos pós a esterilização com seringas hipodérmicas.

- Diluição em série sob condições reduzidas: A amostragem do efluente dos reatores foi feita sob fluxo constante de N_2 reduzido. Um segmento da tubulação

próximo à saída do efluente de cada reator foi fechado com presilha. O gás reduzido foi injetado no segmento anterior à presilha e ao mesmo tempo foi retirado sob pressão um volume desejado da amostra, que foi colocado imediatamente em um frasco gaseificado. A partir do líquido deste frasco, o inóculo foi submetido à diluição em série. Para isso foi usada seringa de 10 mL e o procedimento de diluição foi feito como segue: sob N_2 injetado no frasco inóculo foi retirado 1 mL do líquido que foi transferido para o primeiro frasco contendo 9 mL de diluente. O frasco foi homogenizado e 1 mL da diluição foi retirada com a seringa. Com a mesma seringa foram retirados 2 mL de nitrogênio, que foram injetados no segundo frasco da diluição, criando uma atmosfera positiva de modo que permitiu retirar 1 mL dessa diluição e injetar no terceiro frasco da sequência. Procedeu-se assim, até que se completasse a diluição decimal desejada.

- Inoculação nas séries de frascos para técnica do NMP: para a técnica de NMP foram inoculadas no mínimo três séries em cinco repetições para cada grupo a ser avaliado, iniciando pela série mais diluída. Para iniciar a inoculação 6 mL de nitrogênio foram coletados com a seringa e injetados no frasco da diluição mais alta. Do frasco que continha o inóculo foram retirados 5 mL e injetados 1 mL por frasco, nos cinco frascos que constituíam a série. Em seguida, passou-se à diluição imediatamente mais baixa, com a mesma seringa e assim por diante. Após a inoculação, os frascos foram gaseificados com a mistura 80% CO_2 /20% H_2 , mantendo-se pressão de 1 atm no interior dos mesmos, lida através

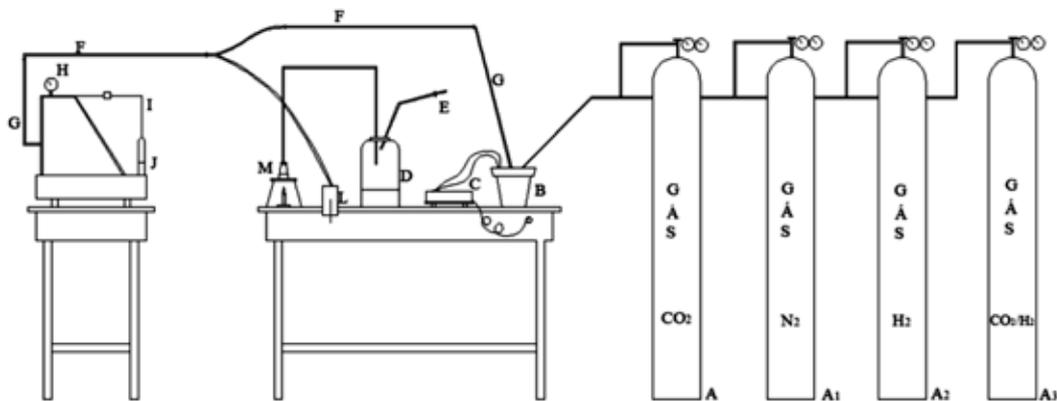
do manômetro inserido no sistema de distribuição dos gases.

O esquema ilustrativo da unidade experimental está apresentado na figura 1.

poderiam ser capazes de se desenvolver em condições termofílicas.

- Adição de cianeto: Como forma de avaliar a metodologia proposta, foi

Figura 1. Esquema ilustrativo da unidade experimental: A, A₁, A₂, A₃ - cilindros de gases, B - coluna de cobre com 2 m de comprimento e 0,65 cm de diâmetro, C - termostato, D - frasco para controle da saída de gases, E - saída para meio externo, F - tubulação de borracha especial, G - tubulação de cobre, H - manômetro, I - agulha, J - frasco com meio de cultivo para introdução de gás, L - seringa com agulha para introdução de gás, M - meio de cultivo



Fonte: Os autores

- Cultivo dos microrganismos: Após as inoculações os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a 35° C por quatorze dias. As variáveis analisadas após o período de incubação foram: (a) anaerobiose – pela descoloração do indicador (resazurina) em meio reduzido e coloração (rósea) em meio oxidado; (b) crescimento por turvação; (c) produção de gases em tubo de Duran; (d) alteração do pH do meio de crescimento observado por indicador de Arhenius. A separação dos microrganismos em grupos acidogênicos e arqueias metanogênicas foi feita por tratamento térmico do inóculo a 80°C/15 minutos (Cereda et al., 1986 e 1990), visando inativar as arqueias metanogênicas, inclusive àquelas que

provocando no reator um “choque” de cianeto na dose de 750 mg/L que segundo Yang et al. (1980) e Yang (1982) era suficiente para restringir o processo de digestão anaeróbia por pelo menos dez dias. Fez-se o acompanhamento microbiológico desta fase e da recuperação do sistema.

- Determinações analíticas: metano por cromatógrafo CG modelo 370, pH (APHA, 1995) e cianeto total (CETESB, 1978).

Resultados e Discussão

Após 48 dias de operação do reator metanogênico, verificou-se que seu desempenho era estável e, considerou-se que o reator estava em estado de equilíbrio dinâmico aparente. Nesse período, constatou-se que o gás Np

reator anaeróbio apresentava rendimento constante médio de 92% de metano. O pH apresentou-se dentro da faixa esperada para um bom desempenho de reator metanogênico, entre 7,0 e 7,4. Ribas e Cereda (2004) também verificou estabilidade no processo anaeróbio com pH acima de 7,5, remoção de sólidos voláteis (SV) de 42% e metano no biogás de 35%. Já Barana (2000) obteve condições estáveis com pH maior que 7,6, remoção de sólidos voláteis de no mínimo 50% e teor de metano variando de 35% a 68%.

Ao longo de toda fase experimental, foram feitas avaliações microbianas nos efluentes para acompanhar o desempenho dos reatores acidogênico e metanogênico. Mas, inicialmente, foi necessário desenvolver uma metodologia simples e prática para que uma amostra do inóculo colocada nos frascos estivesse isenta de microrganismos metanogênicos quando se pretendia avaliar somente os

acidogênicos. Dessa forma, partiu-se para testes que comprovariam a pasteurização como um método eficiente, pois segundo Cereda et al. (1990) era possível a separação de fases da digestão anaeróbia através do aquecimento do inóculo a 80° C por quinze minutos para eliminar microrganismos metanogênicos.

Para comprovar que a relação temperatura/tempo selecionada por Cereda et al. (1990) era também adequada para inativar as arqueias metanogênicas em tratamento de água residuária de mandioca, realizou-se uma avaliação microbiana com e sem esse tratamento. Os resultados estão apresentados no quadro 1 e se observa que o tratamento térmico foi eficiente na inativação, quanto à produção de metano e contagem pela técnica NMP para este grupo de microrganismos, considerando a detecção de metano como resultado positivo a partir da diluição de 10⁻⁹.

Observou-se que houve turvação em todos os frascos sem tratamento

Quadro 1. Produção de metano e NMP para arqueias metanogênicas em efluente de reator metanogênico com e sem tratamento térmico à 80°C por quinze minutos em meio de cultivo completo (MC) incubado por quatorze dias

Amostragem	Diluição	Produção de metano (série de 5 frascos)					NMP (totais)
		1	2	3	4	5	
Com tratamento térmico	10 ⁻⁹	-	-	-	-	-	< 10 ⁹
	10 ⁻¹⁰	-	-	-	-	-	
	10 ⁻¹¹	-	-	-	-	-	
	10 ⁻¹²	-	-	-	-	-	
Sem tratamento térmico	10 ⁻⁹	+	+	+	+	+	> 2400x10 ⁹
	10 ⁻¹⁰	+	+	+	+	+	
	10 ⁻¹¹	+	+	+	+	+	
	10 ⁻¹²	+	+	+	+	+	

Fonte: Os autores

térmico e o valor da contagem foi devido provavelmente à presença de bactérias acidogênicas, já que não foi detectado metano no biogás e também pelo fato de que o meio (MC) tinha como fonte de carbono além de ácidos orgânicos, carboidratos facilmente biodegradáveis. O crescimento visualizado sugere que os carboidratos foram fermentados e os ácidos foram consumidos pelas metanogênicas.

Portanto, o tratamento térmico a 80°C/15 minutos foi eficiente para inibir o crescimento de metanogênicas para esse tipo de amostra. Sendo assim, os resultados obtidos nesse ensaio, comprovaram a viabilidade de separar grupos de microrganismos nas condições experimentais propostas por Cereda et al. (1990).

Definido isso, partiu-se para a avaliação de grupos de microrganismos em amostras de efluentes dos reatores nos diferentes meios de cultivo.

Reator acidogênico: avaliação dos grupos de microrganismos em amostras de efluente

A água residuária da mandioca sofreu fermentação natural neste reator

por sete dias, durante os quais foram coletadas e analisadas amostras com um e sete dias de fermentação. Os resultados encontrados através do NMP para o número total de microrganismos, acidogênicos e metanogênicos em meios de cultivo mínimo, diferencial e completo, estão expressos no quadro 2.

Os meios de cultivo MM e MD da água residuária da mandioca com sete dias de fermentação em relação à de um dia apresentaram aumento na contagem para o número total e metanogênicas e, em MC houve diminuição do número total e acidogênicas. Isso, provavelmente, devido à presença de ácidos orgânicos consumidos e anaerobiose. O MC apresentou contagens maiores que o MM e MD como éramos de se esperar, uma vez que se constatou a presença de acidogênicas e metanogênicas. O crescimento em MM provavelmente representou o grupo das metanogênicas que utilizam H₂ e CO₂ e ácidos orgânicos, já que esse meio continha ácidos (acético, propiônico, butírico e outros), apresentando contagens menores que o MD e MC.

O meio completo apresentou contagens da ordem de 10¹³, pois tinha como fonte de carbono, ácidos orgânicos e carboidratos, o que deve

Quadro 2. NMP de amostras incubadas por quatorze dias para contagem do número total de microrganismos, acidogênicos e metanogênicos de água residuária de mandioca fermentada por um e sete dias em MM, MD e MC

TRH	Meios de cultivo	NMP (microrganismos/mL)		
		Número total	Acidogênicos	Metanogênicos
1	MM	*	*	*
	MD	5,5 x 10 ⁹	*	*
	MC	17,0 x 10 ¹³	12,0 x 10 ¹³	*
7	MM	2,0 x 10 ⁸	*	2,0 x 10 ⁸
	MD	6,1 x 10 ¹⁰	4,5 x 10 ¹⁰	2,0 x 10 ¹⁰
	MC	4,5 x 10 ¹³	1,8 x 10 ¹³	3,6 x 10 ¹³

Nota: * sem crescimento.

Fonte: Os autores

ter proporcionado fonte de energia suficiente para o crescimento de bactérias acidogênicas. Com tempo de retenção hidráulica (TRH) de um dia não houve formação de gás em qualquer dos meios usados. O meio mínimo também não apresentou crescimento.

Pode-se concluir que os resultados obtidos nas avaliações microbianas do efluente do reator acidogênico, condizem com as características do processo avaliado, indicando predominância de acidogênese no primeiro dia de fermentação da água residuária de processamento de mandioca.

Com sete dias de tempo de retenção hidráulica (TRH), as contagens de grupos fisiológicos apresentaram diferenças. Houve uma diminuição da contagem de microrganismos em MC e aumento nos MD e MM, denotando especialização. Os valores das contagens em MD, com ácidos orgânicos e amido, ficaram entre os do meio mínimo e completo, o que era esperado devido à presença de bactérias hidrolíticas.

O crescimento em meio mínimo, que tinha como fonte de carbono somente ácidos orgânicos, pôde ter proporcionado crescimento de diversos tipos de microrganismos anaeróbios que fermentam a partir destes ácidos.

Segundo Mosey (1983) e Foresti (1994), a partir de substrato que contém ácidos orgânicos, é possível o estabelecimento de microrganismos acetogênicos, que convertem compostos orgânicos reduzidos (como lactato, ácido láctico, ácido propiônico, ácido butírico, etc) em H_2 , bicarbonato e ácido acético. A partir destes produtos formados, outro grupo de bactérias anaeróbias, as homoacetogênicas,

consome o H_2 e o bicarbonato produzindo ácido acético. Enfim, o grupo das arqueias metanogênicas se instalam, como as arqueias hidrogenotróficas conhecidas como *Methanosarcina* sp., que consomem bicarbonato e H_2 , e as acetoclásticas, as *Methanosaeta* sp., que consomem somente ácido acético, convertendo estes produtos a metano. Há sintrofismo entre os grupos de microrganismos, pois um produz o substrato para que o outro possa se estabelecer.

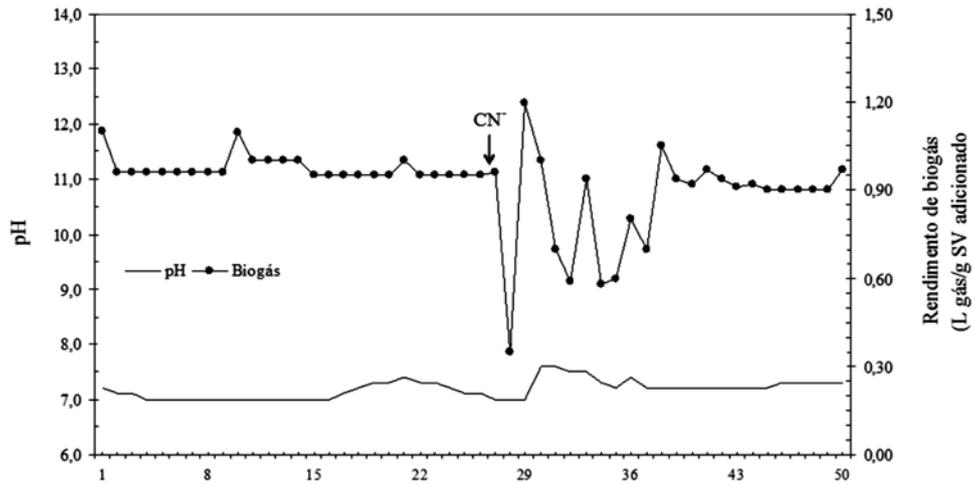
De acordo com o exposto, constatou-se que o meio mínimo pôde ter selecionado microrganismos anaeróbios que fermentam a partir de compostos orgânicos reduzidos como as acetogênicas, homoacetogênicas e, por fim, as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas.

Reator metanogênico: avaliação dos grupos de microrganismos em amostras de efluente após adição de KCN

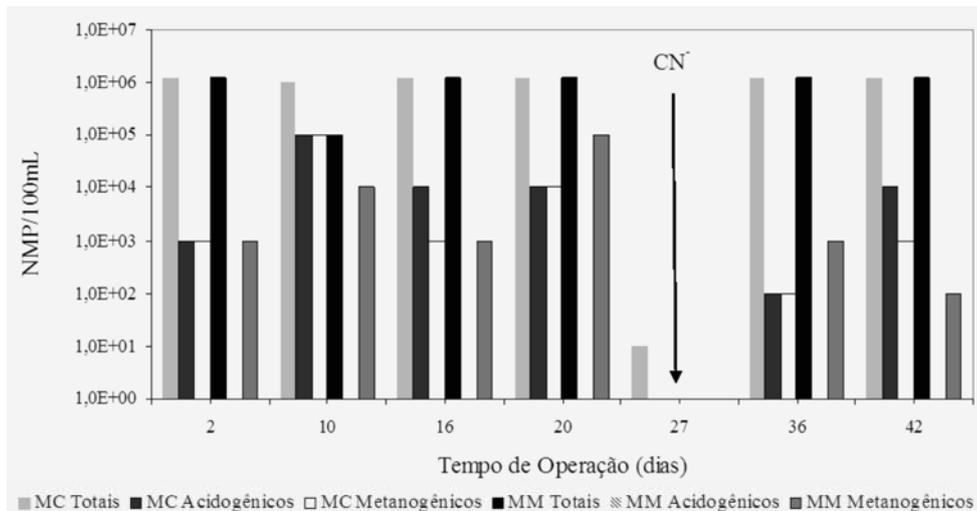
Aos 25 dias de operação, observou-se que reator metanogênico apresentava estabilidade operacional com rendimento de biogás de 0,81 L gás/g SV adicionados, 58% de metano no biogás e pH entre 6,5 e 7,0, conforme pode ser visualizado na figura 2a. Nesse período, as avaliações microbianas obtidas evidenciaram um número elevado de metanogênicas em MC e MM, figura 2b. Em seguida, provocou-se a desestabilização do sistema, adicionando-se ao reator uma carga de cianeto, a fim de verificar esse efeito nas contagens microbianas.

A literatura (YANG et al., 1980; YANG, 1982) enfatiza o efeito tóxico do cianeto em sistemas de digestão

Figura 2. Desempenho do reator anaeróbio de fluxo ascendente com leito fixo: (a) pH e rendimento em gás, (b) Log de NMP de microrganismos totais, acidogênicos e metanogênicos em meio completo e mínimo, em relação ao tempo de operação (a seta indica o momento de do choque de cianeto



a)



b)

Fonte: Os autores

anaeróbia, especificando a dosagem de 750 mg de cianeto por litro de efluente como quantidade suficiente para ocasionar uma paralisação brusca do processo.

No caso do sistema estudado era de se esperar que houvesse maior resistência uma vez que os reatores tratavam água

residuíria de mandioca, que apresenta valores de cianeto ao redor de 90,32mg/L.

Observou-se que nove dias após a introdução da dose de choque de cianeto como KCN (Figura 2a), o rendimento de gás caiu de 0,95 para 0,67 L gás/g SV adicionados, não atingindo a total

paralisação citada devido à adaptação dos microrganismos ao cianeto. Foi observado que houve oscilações no valor de rendimento de 1,19 (terceiro dia após a adição de cianeto) a 0,20 L gás/g SV adicionados, após quatro dias da adição de cianeto. A figura 2, detalhes “a” e “b”, ilustra o desempenho do reator metanogênico durante o período experimental, onde é possível observar a queda imediata de rendimento de biogás e do NMP de todos os grupos de microrganismos.

A partir de dez dias da adição, o reator passou a dar indícios de recuperação, avaliados pela produção de gás e estabilização do processo, provavelmente pela lavagem que foi sendo feita pela alimentação com substrato normal sem grande quantidade de cianeto.

O pH apresentou-se próximo à neutralidade dentro do esperado para um reator anaeróbio com bom desempenho, com exceção do período seguinte à adição de cianeto, quando apresentou ligeira variação para 7,6.

As contagens obtidas, após a adição de cianeto, mostraram que os valores para o número total de microrganismos em MM sofreram uma redução em relação ao período anterior sem adição de cianeto. Os valores obtidos para microrganismo em MM acompanharam os obtidos para número total, mas caíram para níveis mínimos de 10^4 . Nove dias após a adição de cianeto, as contagens voltaram aos valores anteriores e ficaram estáveis. No período avaliado, em MM, as acidogênicas não foram detectadas na diluição usada, confirmando os resultados obtidos anteriormente.

Em MC, os valores para contagens totais também apresentaram redução com relação ao período anterior da adição de cianeto. As contagens de acidogênicas e de metanogênicas foram reduzidas de 10^9 para 10^4 , restabelecendo-se os valores após nove dias da adição de cianeto.

Os resultados das amostragens feitas após a adição de cianeto permitiram comprovar que no primeiro dia houve redução do número de todos os grupos fisiológicos de microrganismos avaliados, sendo a recuperação das acidogênicas mais acentuada que os demais grupos. No décimo quinto dia após a adição, houve inversão de grupos de microrganismos, predominando o grupo das acidogênicas sobre as metanogênicas (MC). No MM as metanogênicas estritas diminuíram, assim como o número total de microrganismos.

O pico observado na produção de gás mostra que parte das metanogênicas continuou em atividade, produzindo metano a partir dos ácidos existentes. O esgotamento desse substrato poderia ser evidenciado pelo aumento do pH e pela queda subsequente da produção de gás, o que não chegou a ser observado.

Esta rápida recuperação do sistema após uma carga de choque de cianeto em dose única pode estar relacionada com o leito fixo do reator alimentado continuamente, o que leva o reator a uma maior estabilidade operacional por reter dentro do reator por maior tempo os microrganismos anaeróbios.

Conclusões

De acordo com os objetivos propostos nesse trabalho, em que

se desejava testar uma metodologia prática e de custo baixo de avaliação de diferentes grupos de microrganismos que predominam em reatores de fases separadas baseado na técnica desenvolvida por Hungate em 1950, a pesquisa desenvolvida permitiu concluir que:

- o choque térmico pela pausterização a 80° C pelo tempo de quinze minutos foi suficiente para eliminar as arqueias metanogênicas, inclusive as termófilas que se desenvolvem em altas temperaturas. Essa prática permitiu separar e avaliar os grupos de acidogênicas e metanogênicas;

- o MM pode ser considerado como meio de cultivo seletivo para o grupo de

metanogênicas estritas, não tendo sido constatado crescimento de acidogênicas nesse meio;

- a metodologia refletiu as variações no processo fermentativo acidogênico e metanogênico nos reatores estudados.

Ressalta-se que a pesquisa focou as condições operacionais para os tipos de reatores avaliados na digestão anaeróbia de água residuária de mandioca e, que um estudo mais detalhado é necessário para validar a técnica em outras condições experimentais. Além disso, recomenda-se o uso de técnicas mais modernas quando se faz necessária precisão ou identificação dos grupos de microrganismos envolvidos.

Referências

APHA - American Public Health Association, American Watert Works Association, Water Environment Federation. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington. 19nd ed, Washington D.C., 1995.

ATLAS, R. S.; BARTHA, R. Determination of microbial, biomass and activities. *Microbial ecology – fundamental and application*, p. 81-132, 1981.

BARANA, A. C. *Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica*. 2000. 95f. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CEREDA, M. P.; FLORS, A.; VALLÉS, S.; ALBEROLA, J. Tratamiento anaerobio en dos fases de suspensiones amiláceas. I. Fase acidogênica. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, Valência, v.26 n.1 p.101-108, 1986.

CEREDA, M. P.; FLORS, A. B.; VALLES, S. A.; ALBEROLA, J. Tratamiento anaeróbico em duas fases de suspensões amiláceas. II. Fase metanogênica. Influência da adição de cianeto. *Revista brasileira de microbiologia*, São Paulo, v.21 n.1 p.73-78, 1990.

CEREDA, M. P.; MATTOS, M. C. Y. Linamarin: the toxic compound of casava. *Journal of venomous animals and toxins*, v. 2, n.1, p. 6-12, 1996.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, p. 13-37, 2001.

CHEN, M. Adaptation of mesophilic anaerobic sewage fermentor populations to thermophilic temperatures, *Applied and environmental microbiology*, v. 45, n.4, p.1271-1276, 1983.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. *Determinação de cianeto total em águas: método da piridina-pirazolona ou nitrato de prata com destilação prévia*. São Paulo, 1978. 12p. (Normatização técnica).

CONN, E. E. Cyanogenesis: a personal perspective. *Acta Horticulturae*, n. 375, p. 31-43, 1994.

CUNHA, M. E. *Metodologia para avaliação de grupos fisiológicos de microrganismos em digestão anaeróbia*. 1990. 67f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FORESTI, E. Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO – TRATAMIENTO ANAEROBIO DE ÁGUAS RESIDUALES, 3., 1994, Montevideo. *Anales...Montevideo – Uruguay*: Graphis, 1994. p. 97 –110.

GIAJ-LEVRA, L. A. *Estudo de metodologia de contagem para bactérias anaeróbias celulolíticas*. 1991. 140f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

HIRASAWA, J. S. *Avaliação da comunidade microbiana anaeróbia em reator sulfetogênico utilizando a hibridação in situ com sondas fluorescentes (FISH)*. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

HUNGATE, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Reviews*, v. 14, n. 1, p. 1: 49, 1950.

LACERDA, T. H. M. *Estudo cinético da fase metanogênica de substrato de água residual de processamento de mandioca*. 1991. 114 f. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu Brasil.

JONES, W. J.; PAYNTER, M. J. B. Populations of methane producing bacteria and in vitro methanogenesis in salt marsh and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 864-871, 1980.

LEEDLE, J. A. Z.; HESPELL, R. G. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v.39, n.4, 709-719, 1980.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science and Technology*, 15: 209-232, 1983.

RIBAS, M. M. F.; CEREDA, M. P. Ensaio preliminares de estabilização do resíduo manipueira com calcário, na fase ácida de biodigestores anaeróbios. In.: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 2., 2001, Campinas, *Anais...* Campinas: Embrapa Meio Ambiente, 2001.

RIBAS, M. M. F.; CEREDA, M. P. Comparação da estabilização da manipueira com calcário e hidróxido de sódio na fase acidogênica da biodigestão anaeróbia. *Energia na Agricultura*, v.19, p.33 – 46, 2004.

RIBAS, M. M.; CEREDA, M. P. Stabilization of cassava wastewater during acidogenic phase in anaerobic reactor with sodium hydroxide and two sizes of dolomitic limestone. *Journal of Food Crops*, Trivandrum, v.29, p.1-6, 2003.

VAZOLLER, R. F. *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. 1995. 259 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

VAZOLLER, R. F. (2002). *Biodiversidade: perspectivas e oportunidade tecnológicas*. Base de Dados Tropical. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/3/rosana.html>>. Acesso em: 18 jun. 2002.

YANG, C. H. J.; SPEECE, R. E.; PARKIN, G. F.; GOSSET, J.; KOCHER, W. The response of methane fermentation to cyanide and chloroform. *Progress in Water Technology*, v. 12, p. 977-989, 1980.

YANG, C. H. J. The effects of cyanide and chloroform toxicity on methane fermentation. *Diss. Abstr. Int.*, 428, p. 3386-3387, 1982.