

### **III-044 - ANÁLISE QUANTITATIVA DE GRUPOS BACTERIANOS FUNCIONAIS EM AMOSTRAS DE BIODIGESTORES ANAERÓBIOS PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS**

**Geisa Vieira Vasconcelos Magalhães**<sup>(1)</sup>

Doutoranda em Engenharia Civil e Mestre em Engenharia Civil, com área de concentração em Saneamento Ambiental, pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Graduação em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE).

**Ari Clecius Alves de Lima**<sup>(2)</sup>

Doutor em Engenharia Civil e Mestre em Engenharia Civil, com área de concentração em Saneamento Ambiental, pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Graduação em Engenharia Química pela UFC.

**Fátima Cristiane Teles de Carvalho**<sup>(3)</sup>

Bióloga. Mestre Ciências Marinhas Tópicais- LABOMAR- UFC. Doutora em Ciências Marinhas Tópicais- LABOMAR- UFC. Bolsista PNPd do Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Pesca - PPGEp

**Oscarina Viana de Sousa**<sup>(4)</sup>

Engenheira de Pesca pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutora em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPG/UFRJ). Professora da Universidade Federal do Ceará (LABOMAR/UFC).

**Ronaldo Stefanutti**<sup>(5)</sup>

Professor adjunto/Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará (UFC). Graduado em Engenharia Agrônoma pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), mestrado em Ciências pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (USP) e doutorado em Ciências pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (USP).

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua do Anjo Branco 1131, apt 904 torre alegria Fortaleza, Ceará CEP: 60822165 e-mail: [geisavieira@hotmail.com](mailto:geisavieira@hotmail.com)

#### **RESUMO**

A biodigestão anaeróbia pode ser utilizada para o tratamento de uma grande variedade de substratos, dentre eles os resíduos sólidos orgânicos, visando a produção de biogás e geração de energia sustentável. Um dos pontos importantes é saber quais as bactérias estão presentes em maior quantidade e sendo assim foi realizada a quantificação diferencial de grupos bacterianos heterotróficos cultiváveis funcionais importantes nas etapas de degradação de resíduos orgânicos em biodigestor orgânico, lodo de fossa séptica e lodo de uma ETE de cervejaria. Após a realização das contagens a amostra de lodo tanto de fossa séptica como de cervejaria apresentaram boas quantidades de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) que são consumidoras da matéria orgânica predominante, porém também apresentaram quantidades maiores de bactérias redutoras de sulfato na qual iram inibir a produção de biogás. Já a amostra do biodigestor apresentou menores quantidades dos grupos envolvidos na digestão do material orgânico (BHC), entretanto, nessa amostra foi encontrada a menor quantidade de bactérias redutoras de sulfato que são importantes inibidoras dos processos de digestão anaeróbica interferindo na produção de biogás. Concluímos que os três tipos amostras são ótimos para o tratamento do resíduo orgânico, sendo o biodigestor com substrato orgânico é melhor para produção de biogás.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias, biodigestor, biogás, lodo.

#### **INTRODUÇÃO**

No Brasil são produzidas cerca de 241.000 toneladas por dia de resíduos sólidos urbanos, sendo que apenas 10% desse total recebem alguma forma de tratamento e/ou disposição final adequada. Mais da metade desse material é de matéria orgânica passível de fermentação e a destinação inadequada desse material torna-se um problema ambiental e de saúde pública (Reis, 2012). O uso de tecnologias viáveis para tratar esse tipo de material é um passo importante na gestão de resíduos no país.

Segundo Han *et al.*, 2013 a remoção da matéria orgânica dissolvida em biorreator de membrana pode ser atribuída principalmente pela biodegradação por microrganismos heterotróficos. A digestão anaeróbica de matéria orgânica é realizada por consórcios de bactérias em uma série de interações metabólicas interdependentes. No processo, produtos resultantes da degradação de um grupo servem como substrato para outro grupo e assim sucessivamente (Laufer, 2008).

Os grupos participantes são formados por bactérias com comportamentos fisiológicos distintos e que estão envolvidos nas quatro etapas principais da fermentação: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (MATA-ALVAREZ, 2003). Parte da fração é convertida para biogás e o restante produz material bioestabilizado que pode ser utilizado como insumo agrícola (Leite *et al.*, 2009).

Sabe-se, entretanto, que falhas na manutenção do balanço entre esses grupos de microrganismos é a causa primária de instabilidade dos reatores (Demirel and Yenigun, 2002; Chen *et al.*, 2008). Portanto, para obter a estabilidade nos sistemas de digestão anaeróbica é preciso conhecer seus diversos componentes microbianos e entender as relações entre eles.

O objetivo desse trabalho foi a quantificação diferencial de grupos bacterianos heterotróficos cultiváveis funcionais importantes nas etapas de degradação de resíduos orgânicos de diferentes fontes em biodigestores anaeróbios visando a produção de biogás.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram provenientes do biodigestor com substrato orgânico (amostra A) localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC), inóculo lodo de cervejaria (Amostra B) e inóculo lodo de fossa séptica (Amostra C).

### Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (aeróbias e anaeróbias)

A quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis foi feita segundo a metodologia de Downes & Ito (2001). O método utilizado foi o de Contagem Padrão em Placas usando o meio de cultura Agar Nutriente. Aliquotas de 1 mL das diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram inoculadas em duplicata utilizando a técnica de *Pour Plate*.

Após esse procedimento um conjunto de placas foi incubada em estufa a 35°C por 48h para crescimento de bactérias aeróbias e outro conjunto foi incubado em jarras de anaerobiose a 28°C por 48h para crescimento das bactérias anaeróbias como mostra a Figura 1.

### Bactérias Proteolíticas

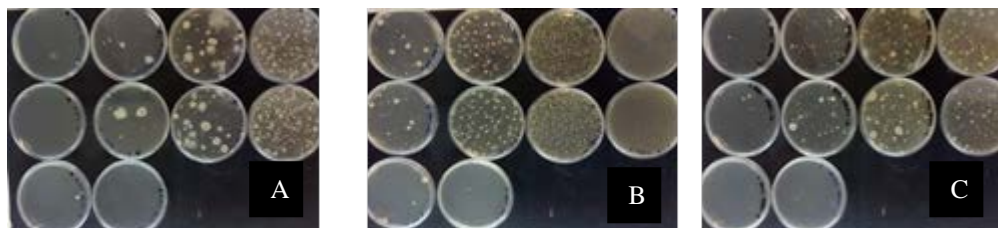
O número de bactérias proteolíticas cultiváveis foi determinado segundo a metodologia de Downes & Ito (2001). O método utilizado foi a Contagem Padrão em Placas usando o meio de cultura seletivo Agar Leite. Aliquotas de 1 mL das diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram inoculadas em duplicatas utilizando a técnica de *Pour Plate*. Após esse procedimento as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 48h como mostra a Figura 2.

### Bactérias Lipolítica

A abundância de bactérias lipolíticas nas amostras foi determinada segundo a metodologia de Downes & Ito (2001). O método utilizado foi a Contagem Padrão em Placas usando o meio de cultura Agar Mineral + óleo de soja 5%. Aliquotas de 1 mL das diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram inoculadas em duplicatas utilizando a técnica de *Pour Plate*. Após esse procedimento as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 72h.

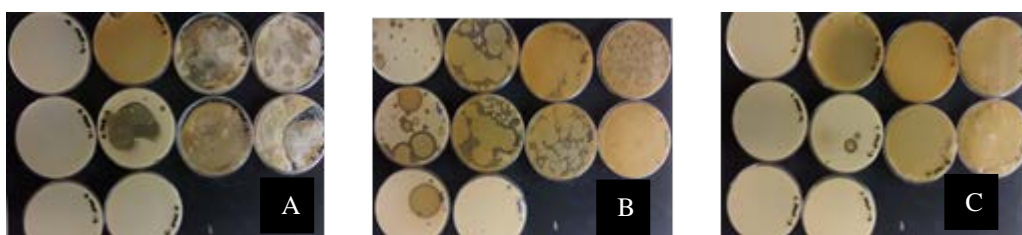
### Deteção de Bactérias Redutoras de Sulfato

Foi utilizado o meio de cultura Postagat B acrescido de ágar para quantificação de bactérias redutoras de sulfato em condição de ausência e presença de oxigênio. Aliquotas de 1 mL das diluições das amostras ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram inoculadas em duplicata utilizando a técnica de *Pour Plate*. Conjuntos de placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por até 72h (presença de oxigênio) e em jarra de anaerobiose por até 72h (ausência de oxigênio) como mostra a Figura 3.



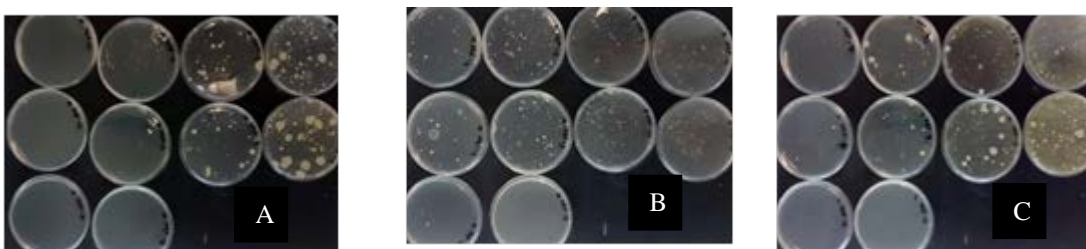
A-amostra do biodigestor; B- amostra de lodo de uma cervejaria; C- amostra de lodo de uma fossa

**Figura 1: Crescimento típico de colônias de bactérias heterotróficas cultiváveis aeróbicas sobre o meio Agar Nutriente.**



A-amostra do biodigestor; B-amostra de lodo de uma cervejaria; C- amostra de lodo de uma fossa.

**Figura 2: Crescimento típico de colônias de bactérias Proteolíticas sobre o meio Agar Leite.**



A-amostra do biodigestor; B-amostra de lodo de uma cervejaria; C- amostra de lodo de uma fossa.

**Figura 3: Crescimento típico de colônias de bactérias Sulfato Redutora de Fosfato sobre o meio Agar GL.**

## RESULTADOS

Os resultados das contagens de bactérias funcionais utilizando meios de cultura seletivos e condições de tempo e temperatura adaptados estão na Tabela 1. Pode-se verificar que as BHC anaeróbicas e aeróbicas foram mais abundantes nas amostras B e C.

Esse grupo bacteriano comporta uma série de subgrupos que desempenham importante papel na conversão da matéria orgânica em moléculas menores com quebra das cadeias protéicas em peptídeos e aminoácidos, mono e polissacarídeos; gorduras e fosfolipídios em ácidos graxos pela ação de enzimas extracelulares como proteases (bactérias proteolíticas), amilases (bactérias amilolíticas) e lipases (bactérias lipolíticas). Entre essas bactérias temos grupos aeróbios restritos e facultativos e anaeróbios.

Na amostra A as bactérias proteolíticas foram relativamente mais abundantes dentro do grupo das BHCs que as outras amostras. Já na amostra C as bactérias lipolíticas é que foram relativamente mais abundantes.

Em matrizes líquidas, a principal rota de remoção de enxofre é através da redução biológica do sulfato a sulfeto que é realizado por procariotos redutores de sulfato, principalmente bactérias (Gibson, 1990). Essa redução biológica do enxofre está associada à respiração anaeróbica do sulfato, ocorrendo armazenamento de energia celular a partir da oxidação de um substrato (Madigan et al., 2010).

Nos reatores essas bactérias redutoras de sulfato são interferentes porque competem com as outras bactérias envolvidas na produção de metano e o sulfeto formado é tóxico para a grande parte dos grupos bacterianos envolvidos na fermentação no sistema de reator (Harada et al., 1994; Cheng et al., 2008).

Apesar de descritas como anaeróbicas obrigatórias, sabe-se que BRS são capazes de sobreviver e até levar vantagem em presença de oxigênio molecular. Assim, a menor contagem de BRS foi feita na amostra A incubada em condições de ausência de oxigênio. Nas outras amostras esse grupo apresentou abundância equivalente.

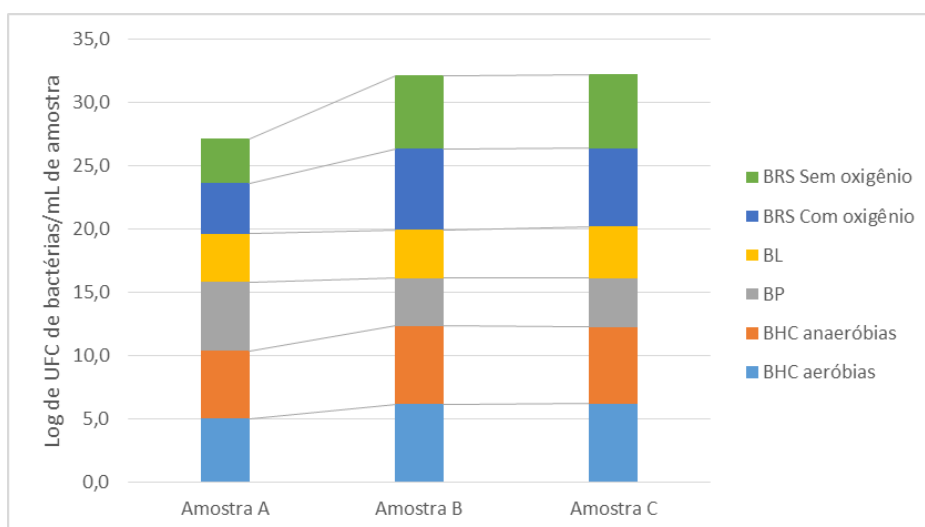
**Tabela1: Contagens dos grupos bacterianos funcionais em amostras de lodo (Fortaleza-Ceará).**

	BHC		BP	BL	BRS	
	aeróbicas	anaeróbicas			com oxigênio	sem oxigênio
Amostra A	$96 \times 10^3$	$23 \times 10^4$	$3 \times 10^5$	$66 \times 10^2$	$1 \times 10^4$	$31 \times 10^2$
Amostra B	$14 \times 10^5$	$15 \times 10^5$	$6 \times 10^3$ est.	$71 \times 10^2$	$25 \times 10^5$	$64 \times 10^4$
Amostra C	$16 \times 10^5$	$11 \times 10^5$	$75 \times 10^2$ *	$12 \times 10^3$	$16 \times 10^5$ *	$73 \times 10^4$

\*valor estimado; BHC: bactérias heterotróficas cultiváveis; BP: bactérias proteolíticas; BL: bactérias lipolíticas; BSR: bactérias Sulfato Redutoras; Amostra A: biodigestor; amostra B: lodo de cervejaria; amostra C: lodo de fossa séptica

Na Figura 4 é fácil verificar a menor abundância dos grupos funcionais na amostra A em comparação com as amostras B e C com exceção para o grupo das BRS. Na presença de oxigênio as BRS, não apresentam crescimento celular, isto é o aumento da biomassa, mas não morrem pelo contato com o oxigênio. A redução pode ser inibida na presença do oxigênio, só que quando este é esgotado do meio, a produção de metano e redução de sulfato volta a ocorrer.

BRS foi maior na presença de oxigênio, na qual pode ter favorecido algumas populações de bactérias tolerantes ao oxigênio e que utilizam o sulfato. As bactérias proteolíticas que produzem a enzima protease para degradar as proteínas e os peptídeos em amônia e aminoácidos foi encontrada em maior quantidade no biodigestor, onde se tem uma maior quantidade de substrato devido a degradação da matéria orgânica, e as bactérias lipolíticas que utilizam a enzima lipase que degrada os lipídeos saponificáveis a ácidos graxos de cadeia longa de carbono foi encontrada em maior quantidade no lodo de fossa séptica, incidindo em maiores quantidades de AGV.



**Figura 4: Abundância dos grupos funcionais bacterianos por amostra analisada.**

## CONCLUSÕES

A amostra B, C apresentaram boas quantidades de bactérias BHC que são consumidoras da matéria orgânica predominante e por isso consideradas os principais agentes primário. Mas também apresentaram quantidades maiores de BRS na qual iram inibir a produção de biogás.

A amostra A (biodigestor) apresentou menores quantidades dos grupos envolvidos na digestão do material orgânico (BHC), entretanto, nessa amostra foi encontrada a menor quantidade de bactérias redutoras de sulfato que são importantes inibidoras dos processos de digestão anaeróbica interferindo na produção de biogás.

Então podemos concluir que o biodigestor é um ótimo tratamento para os resíduos orgânicos, pois apresentaram pequenas quantidades de bactérias redutoras de sulfato e obtendo uma boa degradação da matéria orgânica e produção de biogás.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA - American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater. A. E. Greenberg; L. S. Clesceri; A. D. Eaton. (eds.). APHA/AWWA/WEF, 2000. p.1-10.
2. DOWNES, M. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4<sup>th</sup> ed., Washington: Ed. APHA, 2001. p. 676.
3. GIBSON, G.R. (1990). Physiology and ecology of the sulfate-reducing bacteria. Journal of Applied Bacteriology 69(6): 769-797
4. MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. Microbiologia de Brock. 12a. edição. Prentice Hall, 1160 p.2010
5. REIS, A.S. TRATAMENTO DE RESÍDUOS SÓLIDOS ORGÂNICOS EM BIODIGESTOR ANAERÓBIO. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental. 79 p. 2012
6. CHEN, Y., CHENG, J. J., & CREAMER, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. Bioresource technology, 99(10), 4044-4064.
7. DEMIREL, B., & YENIGÜN, O. (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77(7), 743-755.
8. HARADA, H., UEMURA, S., MONOMOI, K., 1994. Interactions between sulphate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulphate. Water Res., 355–367.