

II-300 – AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA EM UM REATOR UASB SUBMETIDO A CARGAS CRESCENTES DE VINHAÇA**Adis Ivonne Terry Brown⁽¹⁾**

Bióloga pela Universidad de Oriente, Santiago de Cuba – Cuba. Mestre em Biotecnologia “Mención Ambiental” pela Universidad de Oriente. Professora e Pesquisadora do Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Universidad de Oriente, Santiago de Cuba – Cuba. Doutoranda em Hidráulica e Saneamento na EESC/USP.

Eloisa Pozzi

Ecóloga pela UNESP – Rio Claro. Mestre em Hidráulica e Saneamento EESC- USP. Doutora em Ecologia e Recursos Naturais UFSCar e Pesquisadora do Laboratório de Processos Biológicos SHS-EESC/USP.

Vinícius Carvalho Rocha

Engenheiro Ambiental pela Universidade Federal de Viçosa. Mestrando em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP).

Eduardo Cleto Pires

Engenheiro mecânico pela Escola de Engenharia de São Carlos, (EESC/USP). Mestre em Engenharia Mecânica pela PUC-RJ e Doutor e Livre-Docente em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Pós-doutoramento na “Miami University” em Oxford-Ohio. Professor Titular do Depto. de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP).

Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

Engenheira Civil, pela EESC-USP. Mestre e doutora em Hidráulica e Saneamento, pela EESC-USP. Pós-doutoramento em Hidráulica e Saneamento EESC-USP e Engenharia Química UFSCar. Professora do Depto. de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP).

Endereço⁽¹⁾: Av. Trabalhador São-carlense, 400 – Arnold Schmidt – São Carlos – SP – CEP: 1566-590 – Brasil – Tel: (16) 3373 9571 – e-mail: adisivonne.terrybrown@gmail.com

RESUMO

O acompanhamento da evolução dos microrganismos e seu arranjo podem contribuir com proposição de estratégias de partidas e operação de reatores UASB, especialmente para águas residuárias de elevada concentração como a vinhaça. O objetivo principal deste trabalho foi acompanhar as alterações na diversidade microbiana em um reator UASB de volume útil de 10L, tratando vinhaça de destilaria de álcool de cana-de-açúcar. O reator foi inoculado lodo granular proveniente de UASB tratando efluente de avícola. A carga orgânica volumétrica (COV) variou de 1,0 e 3,0 g DQO/L.d. nos 101 dias de experimento. A técnica de biologia molecular de DGGE permitiu constatar que a microbiota bacteriana mostrou-se mais diversa do que a de arqueias e que, aparentemente, foram mais sensíveis à pressão seletiva ocasionada pela alteração de substrato e aumento da carga orgânica.

PALAVRAS-CHAVE: Vinhaça, UASB, Microscopia, DGGE, PCR.

INTRODUÇÃO

A vinhaça é um subproduto líquido, proveniente da fabricação do álcool e açúcar, com concentração orgânica de até 100g/L de DQO, constituindo-se em preocupação em relação à sua destinação final. É produzida a temperaturas entre 80 e 90° C e após resfriamento, tem sido aplicada *in natura* no solo visando utilizar suas propriedades fertilizantes.

A inserção do tratamento anaeróbio da vinhaça, anteriormente ao seu lançamento no solo, tem como objetivos reduzir o aporte de carga orgânica e consequentemente a colmatação do solo e explorar o potencial energético do metano.

O reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) permite o tratamento de águas residuárias a altas taxas devido à formação de lodo granular de elevada concentração de biomassa, mantida no reator devido ao separador trifásico interno, que permite também a separação e direcionamento do biogás produzido. A configuração do reator UASB permite o desenvolvimento de elevada quantidade de biomassa ativa com

elevado tempo de retenção celular, possibilitando a aplicação de altas cargas volumétricas e curto tempo de detenção hidráulica (TDH).

Os grânulos são agregados densos de biomassa anaeróbia com elevada atividade específica. O processo de agregação, desencadeado sem a necessidade de meio suporte, é o resultado de um conjunto de interações complexas envolvendo fenômenos físico-químicos, fisiológicos e ecológicos (Schmidt J.E. & Ahring B.K., 1996).

O êxito do reator UASB depende da formação e manutenção dos grânulos, com elevada taxa de utilização do substrato (Lettinga *et al.*, 1980, Grotenhuis *et al.*, 1991). A adaptação dos microrganismos e granulação frente a um substrato tem sido a principal preocupação dos utilizadores dessa tecnologia. A necessidade de manutenção de condições ambientais adequadas ao desenvolvimento e manutenção dos microrganismos tem sido alvo de estudos (Singh & Ojha, 2009).

O acompanhamento da evolução dos microrganismos e seu arranjo, frente ao substrato, podem contribuir com proposição de estratégias de partidas e operação de reatores UASB, especialmente para águas residuárias de elevada concentração como a vinhaça. A evolução da biologia molecular nas últimas décadas propiciou avanços nessa linha.

A ecologia microbiana molecular está baseada na compreensão das relações entre microrganismos e suas interações com o ambiente, através de análises de moléculas representativas de organismos ou de processos por eles desencadeados. Entre essas moléculas está o DNA (ácido desoxirribonucleico). A extração de DNA de amostras ambientais, com ampliação posterior e análise de material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao método clássico de cultivo e análise fisiológica de microrganismos (Coutinho *et al.*, 1999; Zilli *et al.*, 2003). Técnicas de análise de DNA podem gerar perfis moleculares, tais como eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), que permite análise de várias amostras ambientais, simultaneamente, que é útil para o acompanhamento e compreensão das variações espaciais e temporais das comunidades microbianas (Zilli *et al.*, 2003). A avaliação da evolução de comunidades microbianas tem sido estudada em amostras de reatores submetidos a alterações de substrato com concentrações crescentes (Buzzini *et al.*, 2006; Sakamoto, 2000; Damianovic *et al.*, 2006).

De acordo com o exposto, o objetivo principal deste trabalho foi acompanhar as alterações na diversidade microbiana frente ao desempenho de um reator UASB tratando vinhaça de destilaria de álcool de cana-de-açúcar.

MATERIAIS E MÉTODOS

ÁGUA RESIDUÁRIA, INÓCULO E OPERAÇÃO DO REATOR

A água residuária utilizada durante os ensaios experimentais foi a vinhaça, produto da destilação do caldo fermentado de sacarose para a produção de álcool, cedido pela usina Nova Era, localizada no Município de Ibaté, SP, Brasil.

O inóculo utilizado foi proveniente de reator UASB, tratando água residuária de abatedouro de aves (avícola DACAR-Tietê/SP).

Para o tratamento contínuo da vinhaça, foi implantado um protótipo de reator UASB construído em acrílico, com volume útil (zona reacional) de 10L. (Figura 1). O reator foi inoculado com uma concentração de 10g STV/L do lodo granular, e a carga orgânica volumétrica (COV) durante o experimento variou de 1,0 e 3,0 g DQO/L.d.

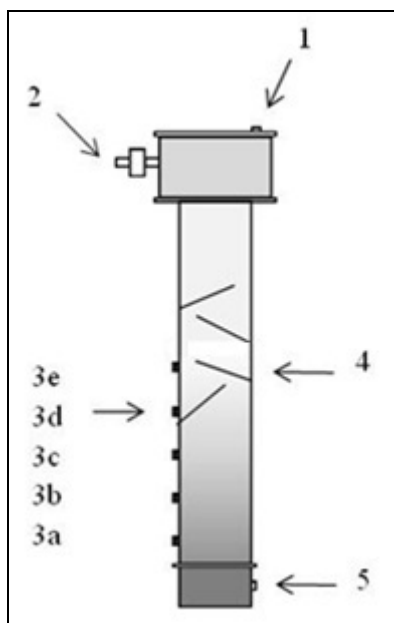


Figura 1 – UASB. 1. Saída de biogás; 2. Saída do efluente; 3 (a,b,c,d,e). Pontos de amostragem; 4. Defletores; 5. Entrada do afluente.

As condições de operação do reator estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições operacionais do reator no período de estudo

Etapa	Tempo de operação (dias)	COV (gDQO/L.d)
1	34	1,0
2	31	2,0
3	36	3,0

ANÁLISES BIOLÓGICAS

Foram realizadas análises microbiológicas do lodo granular de inóculo e do lodo do reator UASB de estudo, em amostras da manta de lodo e da biomassa presente no efluente, no final de cada etapa, relativa às cargas orgânicas aplicadas. Para isso foi utilizado um microscópio “Olympus BH2” para exames de microscopia ótica de contraste de fase e de fluorescência. Como complemento, foi empregada microscopia eletrônica de varredura (MEV), segundo metodologia descrita por Nation (1983) e modificado por Araújo *et al.* (2000) para biofilmes microbianos.

ANÁLISE MOLECULAR DA BIOMASSA DO REATOR

Foram coletadas amostras do inóculo e do lodo do reator e presente no efluente para as cargas aplicadas, no final de cada etapa de operação do reator. A partir dessas alíquotas foi realizada a extração do DNA genômico (Griffiths *et al.*, 2000) para o exame de biologia molecular de PCR e DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturante), com o objetivo de caracterizar-se a microbiota dos Domínios *Bacteria* (Muyzer *et al.*, 1996) e *Archaea* (Kudo *et al.*, 1997), presentes no reator.

Para a comparação entre os diferentes perfis de bandas foram construídos dendrogramas (programa Bionumerics, versão 2.5), para ambos os domínios e analisados pelo índice de similaridade de Jaccard (Goodall, 1966), que considera a presença e ausência de bandas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA BIOMASSA

O uso de microscopia ótica de contraste de fase e fluorescência permitiu avaliar as morfologias dos microrganismos presentes nas amostras do inóculo, assim como aquelas provenientes do lodo granular do UASB (manta de lodo e lodo arrastado no efluente), para cada uma das condições experimentais. Para todos os casos, o exame microscópico revelou diversidade de morfologias celulares, com predominância de arqueias metanogênicas, semelhantes a *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e bacilos fluorescentes (Figura 2a e 2b; 2d; 2e) respectivamente, além de cocos, bacilos curvos e retos não fluorescentes (Figura 2c).

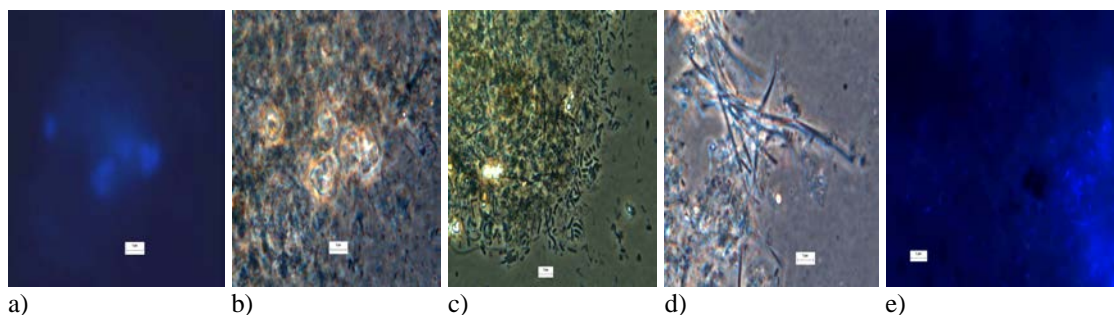


Figura 2 – Microscopia do lodo granular. a) células semelhantes a *Methanosarcina* sp. em fluorescência, b) células semelhantes a *Methanosarcina* sp. Em contraste de fase, c) cocos e bacilos diversos; d) células semelhantes a *Methanosaeta* sp., e) bacilos fluorescentes.

A ampla diversidade do ponto de vista morfológico nas amostras do inóculo, assim como do lodo do reator anaeróbico em estudo, ao longo do período de operação foi evidenciada também pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os cortes nas amostras dos grânulos permitiram observar vários arranjos de células bacilares, cocos e filamentos de *Methanosaeta* (Figura 3 e 4).

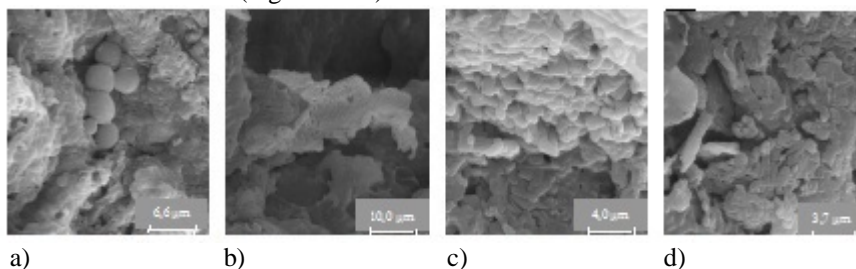


Figura 3 – Micrografias a partir da análise em MEV dos grânulos anaeróbios. a) leveduras, b) arranjo de bacilos, c) cocos e bacilos, d) cocos e cocobacilos.

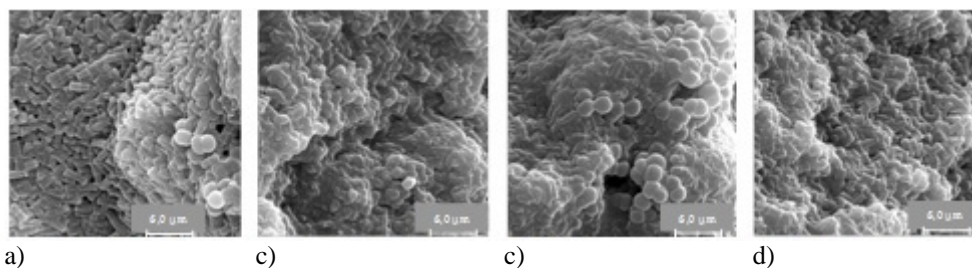


Figura 4 – Micrografias a partir da análise em MEV do inóculo. a) cocos e filamentos curtos de *Methanosaeta* sp., b) cocos e bacilos, c) cocos, d) filamentos de *Methanosaeta* sp.

ANÁLISE MOLECULAR DA BIOMASSA

As figuras 5 e 6, mostram os perfis das bandas de DGGE a partir do gene RNAr 16S amplificado, para os Domínios *Bacteria* e *Archaea* respectivamente, ao longo de 101 dias de operação do reator.

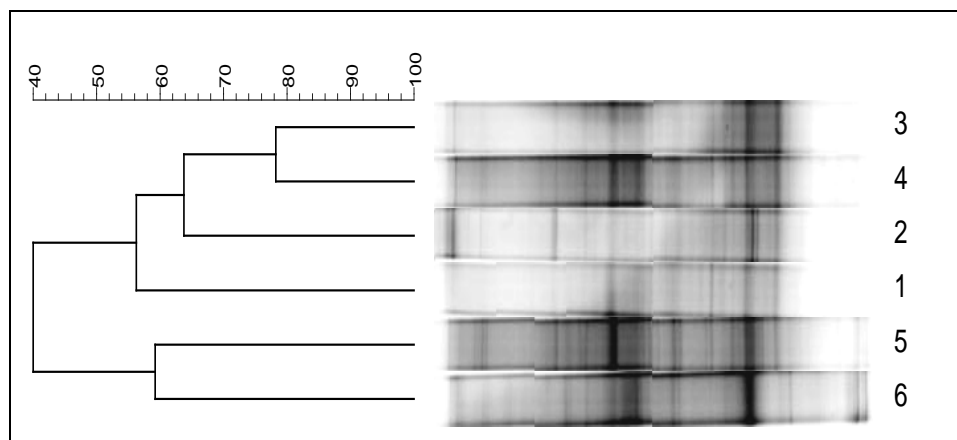


Figura 5. Dendrograma relativo aos perfis de bandas do Domínio *Bacteria* e os respectivos índices de similaridade em porcentagem (Jaccard). 1- amostra de inóculo, 2- manta de lodo com carga de 1,0g DQO/L.d , 3- manta de lodo com carga de 2,0g DQO/L.d, 4- lodo presente no efluente com carga de 2,0g DQO/L.d, 5- manta de lodo com carga de 3,0g DQO/L.d, 6- lodo no efluente com carga de 3,0g DQO/L.d

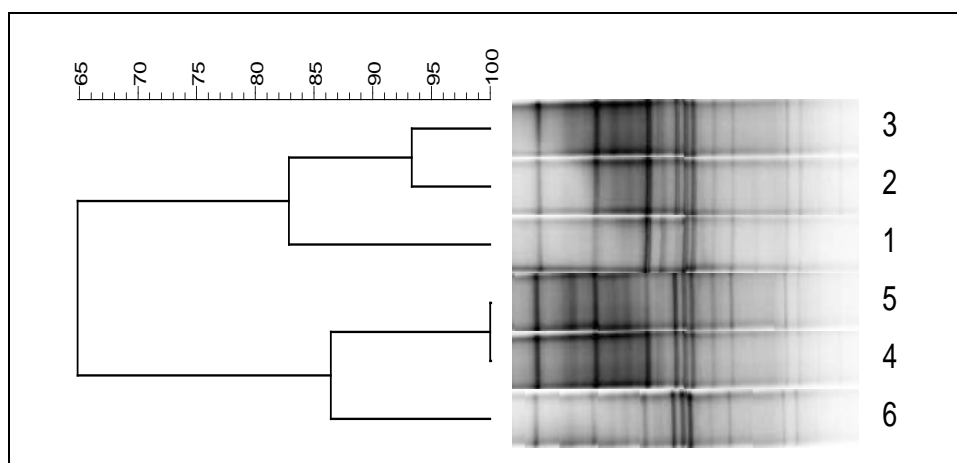


Figura 6. Dendrograma relativo aos perfis de bandas do Domínio *Archaea* e os respectivos índices de similaridade em porcentagem (Jaccard). 1- amostra de inóculo, 2- manta de lodo com carga de 1,0g DQO/L.d, 3- lodo da manta com carga de 2,0g DQO/L.d, 4- lodo presente no efluente com carga de 2,0g DQO/L.d, 5- manta de lodo com carga de 3,0g DQO/L.d, 6- lodo presente no efluente com carga de 3,0g DQO/L.d

Para ambos os domínios houve alteração nos perfis de bandas do gel de DGGE entre a microbiota do inóculo (perfil 1) e do inóculo adaptado (perfil 2), ou seja, a comunidade microbiana diferiu em 44% para domínio *Bacteria* (Figura 5) e em 17% para o domínio *Archaea* (Figura 6), quando submetido a vinhaça.

A alteração do substrato (substituição por vinhaça) e o aumento gradual da carga orgânica possivelmente influenciaram a diversidade da microbiota para ambos os domínios.

Com relação ao domínio *Bacteria*, observa-se 78% de similaridade entre os perfis 3 e 4 (carga orgânica de 1g/L) e 58% entre os perfis 5 e 6 (carga orgânica de 1,5g/L), indicando que aparentemente não houve diferença entre a microbiota bacteriana presente na manta e no efluente.

Com relação ao domínio *Archaea* o agrupamento entre os perfis de bandas para ambas as cargas orgânicas aplicadas, mostrou-se diferente com relação ao domínio *Bacteria*. Os índices de similaridade para o domínio

Archaea foram significativamente maiores do que os índices calculados para o domínio *Bacteria*. Observa-se 94% de similaridade entre os perfis 2 (carga orgânica de 1,0g/L) e 3 (arqueias na manta e carga orgânica de 2,0g/L). O perfil 4 (arqueias no efluente e carga orgânica de 2,0g/L) e o perfil 5 (arqueias na manta e carga orgânica de 3,0g/L) foram iguais (100% de similaridade). A similaridade das arqueias arrastadas no efluente, representadas no perfil 6 (carga orgânica de 3,0g/L), foi de 86% quando comparadas aos perfis 4 e 5.

CONCLUSÕES

A microscopia ótica de contraste de fase e de fluorescência permitiu a observação dos principais morfotipos celulares presentes nas amostras do inóculo, manta de lodo do UASB e do efluente, pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea*. A técnica de biologia molecular de DGGE constatou a diversidade microbiana das amostras nas diferentes condições de carga orgânica aplicada ao reator.

A microbiota bacteriana mostrou-se mais diversa do que a de arqueias, indicado pelos menores índices de similaridade. Entretanto, aparentemente foram mais sensíveis à pressão seletiva ocasionada pela alteração do substrato e pelo aumento da carga orgânica.

A microbiota de arqueias mostrou-se menos sensível ao aumento da carga orgânica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, J. C.; MORTARA, R.; CAMPOS, R.; VAZZOLLER, R. F. (2000). Use of fluorescence In Situ Hybridization to evaluate microbial composition of the anaerobic sludge and biofilms in wastewater treatment systems. In: VI Oficina e Seminario Latinoamericano de Digestão Anaeróbia, Recife. Editora Universitaria da UFPE. 285-291.
2. BUZZINI, A. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B.; PIRES, E. C. Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 168-176, 2006.
3. CHERNICHARO, C.A.L. (1997). Reatores Anaeróbios. Coleção "Princípios do tratamento biológico de águas residuárias", volume 5. Belo Horizonte. Dpto. De Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA), UFMG. 246p.
4. COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P., ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v.3, n.71, p.491-503,1999.
5. DAMIANOVIC M.H.R.Z., SAKAMOTO I.K. AND FORESTI E. (2006). Biofilm adaptation to sulphate reduction in anaerobic immobilized biomass reactors submitted to different COD/Sulphate ratios. *Water Science and Technology* 54(2), 119-126.
6. GOODALL, D.W. (1966). A New Similarity Index Based on Probability. *Biometrics*, 22(4): 882-907.
7. GROTENHUIS J., KISSEL J., POLUGGE C., STAMS A. AND ZEHNDER A. (1991) Role of substance concentration in particle size distribution of methanogenic granules. *Wat. Res.* 25, 21-27.
8. GRIFFITHS, R.I; WITELEY, A. S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. (2000). Rapid method for coercion of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5488-91.
9. KATO, M.T.; NETO, C.; CHERNICHARO, C.A.L.; FORESTI, E; CYBIS, L.F. Configurações de reatores anaeróbios. In: Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Jose Roberto Campos (organizador). Rio de Janeiro: ABES, 1999.
10. KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. (1997). Methanogen Flora of Paddy Soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 39-48.
11. LETTINGA, G.; VAN NELSEN, A.F.H.; HOBMA, S.W.; DE ZEEU, W.W.; KLAPWIJK, A., (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotech. Bioeng.*, 22, 699-734 .
12. MUYZER, G.; HOTTENTRAGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. (1996). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16s rDNA – A New Molecular Approach To Analyze The Genetic Diversity Of Mixed Microbial Communities. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4.: p. 1-23.
13. NATION, J. L.(1983) A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology* 58: 347-351

14. NIELSEN, T. A.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D. A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl Environ Microbiol* 65:1251–8.
15. PIEROTTI, S. M. (2007). Avaliação da partida de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), em escala real, sob condições hidráulicas desfavoráveis. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
16. SCHMIDT J.E., AHRING B.K. (1996). Granular sludge formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 229-246.
17. SINGH, R. P. AND OJHA C. S. P. (2009). Organic loading rate/flow rate regulation during start-up phase in UASB reactor. *IE (I) Journal-EM*, 89: 25-29
18. ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v.20, n.3, p.391-411, 2003.
19. SAKAMOTO I. Use of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to compare the microbial structure of complex microbial communities presented in activated sludge modified for biological excess phosphorous removal. PhD Thesis (in portuguese), Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, 2000.