



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências de Exatas e Tecnologia – CCET
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais – PGTA

Thaís Adriana Colman Novaes

Fungos no tratamento de manipueira

Campo Grande ó MS
Junho de 2011



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências de Exatas e Tecnologia – CCET
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais – PGTA

Thaís Adriana Colman Novaes

Fungos no tratamento de manipueira

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na área de concentração em Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos

Orientador: Prof.^a Dr.^a Paula Loureiro Paulo
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Yvelise Maria Possiede

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Paula Loureiro Paulo
Orientador - UFMS

Prof.^a Dr.^a Sandra Tédde Santaella
UFC

Prof. Dr. Kennedy Francis Roche
UFMS

Campo Grande ó MS
Junho de 2011

Dedicatória

A minha mãe e ao meu pai!

Por todo amor com o qual me criaram!

Agradecimentos

A Deus, presente em todos os momentos de minha vida, por todas as bênçãos recebidas.

À Prof.^a Dr.^a Paula Loureiro Paulo e a Prof.^a Dr.^a Yvelise Maria Possiede pela disposição, orientação, amizade, carinho e acima de tudo pela grande paciência.

À minha querida amiga irmã Edinéia Lazaroto Formagini pela força, dedicação e carinho, sem os quais seria muito difícil seguir em frente. Não me esquecendo da incomparável Mayara Leite, que tornou os meus dias mais alegres e da Ana Cláudia sempre presente com o seu grande coração e boa vontade em ajudar a todos.

Como esquecer a querida Adriana (Drica) que me recebeu de braços abertos, assim como a Luciene sempre compartilhando seus conhecimentos.

À minha pequena grande amiga Socorro e à Prof.^a Dr.^a Sandra Santaella, que me acolheram em Fortaleza e compartilharam comigo seus conhecimentos sobre os tenebrosos fungos.

À Valdívia e ao Rodenir, sempre me ajudando e dando suporte aos meus trabalhos na biologia.

Ao Laboratório de Qualidade Ambiental da UFMS, que forneceu suporte para as análises realizadas durante a pesquisa e aos amigos que fiz lá: Marcelo, Cristina, Maria e Vera, que foram além de suas funções como técnicos, sempre me ajudando nos momentos difíceis.

Aos meus quase estagiários, especialmente Laynara, Rafael, Felipe e Vanessa que me deram suporte sempre que preciso, além da amizade.

Aos meus pais, por terem se esforçado para que eu chegasse onde estou, pela confiança e por todo amor e carinho dedicados a mim. A vocês eu serei sempre grata.

Ao meu antes namorado, agora marido Gabriel Novaes, pelo seu amor e companheirismo.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

E a todos os que não foram citados, mas que de alguma forma participaram desta fase da minha vida, o meu muito obrigado!!!

Sumário

Dedicatória	I
Agradecimentos	II
Sumário	III
Lista de figuras	VI
Lista de Tabelas	VII
Lista de Siglas e Abreviaturas	VIII
Lista de Símbolos.....	IX
Resumo.....	XI
Abstract	XII
1 Introdução Geral.....	1
1.1 Poluição agroindustrial	1
1.2 Efluente de rápida acidificação.....	1
1.2.1 Manipueira	2
1.3 Tratamento biológico de efluentes.....	2
1.3.1 Digestão anaeróbia.....	3
1.3.2 Fungos.....	4
1.4 Escopo e Estrutura da Dissertação.....	7
1.5 Referências bibliográficas	8
2 Isolamento e identificação de fungos desenvolvidos em reator anaeróbio de fluxo horizontal tratando manipueira.....	14
2.1 Resumo.....	14
2.2 Introdução.....	15
2.3 Materiais e Métodos.....	16

2.3.1	Isolamento	16
2.3.2	Identificação	17
2.4	Resultados e Discussão	18
2.5	Conclusões	21
2.6	Referências bibliográficas	22
3	Uso de fungos para o tratamento da manipueira	25
3.1	Resumo.....	25
3.2	Introdução.....	26
3.3	Material e Métodos	27
3.3.1	Microrganismos	27
3.3.2	Efluente de Rápida Acidificação	28
3.3.3	Substrato Sintético	28
3.3.4	Caracterização da Manipueira	28
3.3.5	Teste Preliminar	28
3.3.6	Teste de biodegradabilidade.....	29
3.3.7	Coletas e análises	30
3.4	Resultados e Discussão	31
3.4.1	Caracterização da manipueira	31
3.4.2	Teste Preliminar.....	31
3.4.3	Teste de Biodegradabilidade	32
3.5	Conclusões	40
3.6	Referências	41
4	Digestão anaeróbia de manipueira pré-tratada por fungos.....	44
4.1	Resumo.....	44

4.2	Introdução.....	45
4.3	Material e Métodos	46
4.3.1	Informações preliminares.....	46
4.3.2	Teste de biodegradabilidade anaeróbia.....	47
4.4	Resultados e discussão	48
4.4.1	Testes de biodegradabilidade	49
4.5	Conclusões	52
4.6	Referências	52
5	Conclusões gerais e recomendações	54

Lista de figuras

- Figura 2-1:** Fotos do reator anaeróbio tipo calha de fluxo horizontal: A ó Fechado; B ó Aberto com o detalhamento do local de retirada dos fungos16
- Figura 3-1:** A- Esquema do método de aeração; B- Esquema do método não aerado.29
- Figura 3-2:** Variação do pH durante os testes realizados nas condições aerada (AE), não-aerada (NAE) e não-aerada restrita (NAER), com manipueira (1,5 gDQO.L⁻¹) e glicose (1,0 gDQO.L⁻¹).34
- Figura 3-3:** Relação entre produção de amônia e consumo de nitrato para as condições AE, AE+, NAE e NAE+ para a concentração de 15,0 gDQO.L⁻¹.....36
- Figura 3-4:** Relação entre produção de amônia e aumento do pH nas condições AE e NAE, para as concentrações de 7,0 e 15,0 gDQO.L⁻¹.37
- Figura 3-5:** Amônia produzida entre os testes com e sem meio suporte, para as condições AE e NAE na concentração de 15,0 gDQO.L⁻¹.....38
- Figura 3-6:** Remoção de DQO e elevação do pH para três diferentes condições: aerada (AE); não aerada (NAE); e não aerada restrita (NAER), para DQO inicial foi de 15,0 g.L⁻¹39
- Figura 4-1:** Imagem das medições de metano utilizando o método de deslocamento de líquido48
- Figura 4-2:** Concentrações de: ácido acético; DQO removida; e CH₄-DQO para os testes utilizando manipueira pré-tratada por fungos (pH 6,4 ó Teste A e pH 5,7 ó Teste B).....50
- Figura 4-3:** Atividade metanogênica específica AME das diferentes condições de tamponamento para o teste A(6,4) e teste B(5,7). A inclinação 1 foi calculada a partir do CH₄ produzido nos primeiros 15 dias. Os resultados são médias dos experimentos em triplicata.51

Lista de Tabelas

Tabela 2-1: Classificação dos fungos e suas características macroscópicas.	18
Tabela 3-1: :Caracterização da manipueira	31
Tabela 3-2: Variação de pH e remoção de DQO pela cultura mista de fungos cultivados em manipueira, em 10 dias de experimento.....	31
Tabela 3-3: Tempo de remoção de DQO, pH final e concentração de amônia em todas as concentrações e condições dos testes com manipueira, realizados com meio suporte (+) e sem meio suporte.	33
Tabela 4-1: pH médio final, concentração média de nitrogênio total (NT) e atividade metanogênica específica (AME) para os 2 testes utilizando manipueira pré-tratada por fungos (MPTF) e somente com a manipueira (controle). Os resultados são a média obtida com as triplicatas.....	49

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AE	Aerado
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AME	Atividade Metanogênica Específica
ATP	Adenosina Trifosfato
BDA	Batata Dextrose Ágar
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DA	Digestão Anaeróbia
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DQO	Demanda Química de Oxigênio
MDA	Mandioca Dextrose Ágar
MPTF	Manipueira Pré-Tratada por Fungos
NAE	Não Aerado
NAER	Não Aerado Restrito
PET	Politereftalato de Etileno
PVC	Policloreto de vinila
RPM	Rotação por Minuto
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UV	Radiação Ultravioleta

Lista de Símbolos

μ	Micrômetro
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Cálcio Hidratado
CaCO_3	Carbonato de Cálcio
CH_3COOH	Acetato
CH_4	Metano
CO_2	Dióxido de Carbono
d	dia
g	Gramas
g CH_4 -DQO	Gramas de Metano - DQO
gDQO	Gramas de DQO
g HCO_3^-	Gramas de Bicarbonato
g NaHCO_3	Gramas de Bicarbonato de Sódio
gSVT	Gramas de Sólidos Voláteis Totais
g _{uréia}	Gramas de Uréia
H_2O	Água
HCO_3^-	Bicarbonato
K_2HPO_4	Fosfato Monoácido de Potássio
kg	kilograma
Km	Kilômetro
L	Litros
mg	Miligramas
mg CaCO_3	Miligramas de Carbonato de Cálcio
mgDQO	Miligramas de DQO
mg NH_3	Miligramas de Amônia
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio Hidratado
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N_2	Nitrogênio Gasoso
NaHCO_3	Bicarbonato de Sódio

NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₃	Amônia
NH ₄ ⁺	Íon Amônio
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NT	Nitrogênio Total
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
pH _{unidade}	Unidade de pH
S ²⁻	Sulfeto
SO ₄ ²⁻	Sulfato
SVT	Sólidos Voláteis Totais
t	Tonelada

Resumo

Colman-Novaes T. A. (2011). Fungos no tratamento de manipueira. Campo Grande; 2011. 69p. Dissertação (Mestrado) ó Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

Efluentes agroindustriais, como a manipueira, são ricos em compostos que sofrem rápida acidificação e dependem de difíceis estratégias de tratamento, pois ainda não têm estabelecida tecnologia eficiente e de baixo custo. Em pesquisas realizadas com reator tipo calha anaeróbia de fluxo horizontal operando com uma demanda química de oxigênio (DQO) máxima de 16 g.L^{-1} de manipueira, houve crescimento espontâneo de fungos na entrada do reator, os quais se desenvolveram em pH moderadamente ácido (4,5), em meio praticamente anaeróbio. A comunidade fúngica encontrada foi isolada e identificada. Avaliou-se então a capacidade destes fungos em degradar matéria orgânica e as melhores condições para seu desenvolvimento e eficiência na degradação de matéria orgânica de acidificação rápida, e foram testadas, três diferentes condições ambientais: aerada (AE), não aerada (NAE) e não aerada restrita (NAER), em três diferentes concentrações, com e sem meio suporte. A partir destes resultados, foi estudada a possibilidade de incluir uma etapa preliminar de tratamento por fungos à digestão anaeróbia (DA) buscando elevar o pH visando tamponamento da manipueira. Foram realizados testes de biodegradabilidade anaeróbia da manipueira pré-tratada por fungos, com e sem a adição de tampão. Foram isolados 32 fungos, entre os quais prevalecera o gênero *Aspergillus* sp (11), seguido pelo *Scedosporium* sp (4) e *Paecilomyces* sp (3). A cultura mista de fungos mostrou habilidade em degradar manipueira, com somente 13% de DQO remanescente, em ambas as condições, AE e NAE. A condição NAER se mostrou ineficiente, pois levou 75 dias para remover 85% da matéria orgânica presente no meio. Os resultados indicaram que a concentração inicial de compostos de nitrogênio no meio tem papel importante no tamponamento do sistema. O meio suporte constituído de espuma de poliuretano, não foi eficiente, pois não ocorreu aderência expressiva de biomassa fúngica no mesmo. Pode-se concluir que a cultura mista de fungos estudada foi eficiente no tratamento de manipueira e poderia ser aplicada, tanto como tratamento único, utilizando a condição aerada, quanto como uma etapa preliminar à digestão anaeróbia, utilizando a condição não aerada. A última demonstrou que um tratamento preliminar por fungos apresenta-se como uma estratégia promissora para permitir a digestão anaeróbia de efluentes de rápida acidificação.

Palavras-chave: acidificação; micelial; mandioca; tratamento fúngico; pré-tratamento.

Abstract

Colman-Novaes T. A. Fungi for the treatment of cassava wastewater. Campo Grande. 2011. 69p. Master Dissertation of Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil (in Portuguese).

Agro industrial wastewaters, like cassava-processing wastewater (*manipueira*), are rich in compounds that will cause a rapid acidification, requiring a complex approach for their treatment, as still no efficient low-cost technology exists for this problem. In research carried out using an anaerobic horizontal flow reactor, fed with cassava-processing wastewater with a chemical oxygen demand (COD) of at most 16 g.L⁻¹, spontaneous growth of fungi occurred at the entrance of the reactor. These fungi developed under moderately acid (pH of 4.5) conditions, in an almost anaerobic environment. The fungal culture was isolated and identified. After observing the capacity of these fungi to degrade organic matter, they were tested under different conditions to find the best conditions for their growth and for efficiency in degrading rapidly acidifying organic matter, the conditions tested being: aerated (AE), non-aerated (NAE) and restricted non-aerated (NAER), at three different concentrations, and with and without supporting medium. Based on these results, the possibility to include a fungal pre-treatment step before anaerobic digestion (AD) was studied, aimed at increasing the pH by buffering the cassava-processing wastewater (cww). Thus, anaerobic biodegradability tests of fungal-pre-treated cww were performed, where the fungal-treated cassava-processing wastewater was supplied with and without a buffer. The experiments resulted in 32 isolated fungi, amongst which the type *Aspergillus sp.* prevailed (11), followed by *Scedosporium sp.* (4) and *Paecilomyces sp.* (3), amongst others. The fungal mixed culture was able to degrade cassava-processing wastewater, with an efficiency of 87% relative to COD, under both AE and NAE conditions. The NAER conditions did not show good results, as it took 75 days to remove 85% of the organic matter present in the cultivation medium. The results indicate that the initial concentration of nitrogen-containing species in the cultivation medium play an important role in the buffering of the system. The supporting medium made up of polyurethane foam was not functional, as no significant adhesion of the biomass on the foam occurred. It can be concluded that the studied fungal mixed culture was efficient for the treatment of *manipueira* and can be used, both as a one-step treatment process, under aerated conditions, and as a pre-treatment process before anaerobic digestion, under non-aerated conditions. This last option shows that a fungal pre-treatment technology can be a promising strategy to enable anaerobic digestion of rapidly acidifying effluents.

Keywords: acidification; mycelium; cassava, fungal treatment; pre-treatment.

1

Introdução Geral

1.1 Poluição agroindustrial

O aumento da população mundial e a constante intervenção do homem no meio ambiente estão alterando a qualidade das águas superficiais e subterrâneas com descargas poluidoras e tornando cada vez mais escassos os recursos hídricos (Sampaio e Santaella, 2002).

A agroindústria é um dos segmentos mais importantes da economia brasileira, porém produzem quantidades consideráveis de rejeitos sólidos e líquidos durante todo o processo produtivo (Leucena e Chernicharo, 2005). Os resíduos agroindustriais são gerados no processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar, de álcool, etc., sendo sua geração, geralmente sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima (Matos, 2005). Como os resíduos de grande parte das atividades agroindustriais apresentam concentrações elevadas de material orgânico, o seu lançamento em corpos hídricos pode proporcionar queda na concentração de oxigênio dissolvido nesse meio, cuja magnitude depende da concentração de carga orgânica e da quantidade lançada, além da vazão do curso d'água receptor (Matos, 2005). Estas atividades têm causado problemas sérios de poluição no solo, nas águas superficiais e nas águas subterrâneas, causando significativo impacto ambiental (Matos, 2005).

1.2 Efluente de rápida acidificação

Efluentes como a manipueira e a vinhaça, cuja maior parte da matéria orgânica é de carboidratos, ao sofrerem hidrólise resultam em glicose, frutose e galactose, que são fermentados facilmente (Berg *et al.*, 2004). A decomposição destes compostos de fácil degradação ocorre rapidamente, reduzindo o pH do meio, ocasionando rápida acidificação (Foresti *et al.*, 1999). Isto ocorre porque os microrganismos acidogênicos, responsáveis por essa etapa, possuem taxa elevada de crescimento específico e são menos sensíveis às variações de pH (Chernicharo, 2007). Dessa forma, efluentes com essas características são conhecidos como de rápida acidificação.

1.2.1 Manipueira

A Manipueira é o efluente resultante da industrialização da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), decorrente da prensagem da mandioca ralada e lavada, para a produção de fécula e farinha (Cordeiro, 2006; Nitschke e Pastore, 2006; Vilpoux, 2003). Possui teor elevado de matéria orgânica, devido à presença de carboidratos, açúcares solúveis, matérias graxas e mucopolissacarídeos, e um b-glicosídeo chamado linamarina que é facilmente hidrolisado a cianeto, composto altamente tóxico ao metabolismo de seres vivos, sendo na maioria das vezes descartada *in natura* nos cursos d'água acarretando problemas ambientais (Cordeiro, 2006). De acordo com Cereda (2003), a ação tóxica nos animais é letal, devido à afinidade que o ferro tem com a hemoglobina para formar a cianohemoglobina. Além disso, nas plantas superiores e nos microrganismos, o cianeto interfere na fosforilação oxidativa combinando-se como citocromo oxidase e inibindo o transporte eletrônico e, conseqüentemente, a formação de ATP (Santos *et al.*, 2010).

A manipueira é gerada de acordo com a produção de farinha de mandioca, na proporção de 300 L.t⁻¹ de raiz processada, e na produção de fécula de mandioca na proporção de 600 L.t⁻¹ de raiz processada. Sem solução de baixo custo, este efluente costuma ser descartado em rios e terrenos, originando um problema ambiental grave (Barana, 2002).

A manipueira, originária da produção de fécula apresenta demandas químicas de oxigênio (DQO) variando entre 6,2 gDQO.L⁻¹ (Pawlosky *et al.*, 1991) e 11,5 gDQO.L⁻¹ (Feiden, 2001) a qual pode alcançar valores em torno de 100 gDQO.L⁻¹ na produção de farinha (Barana, 2008). As características do efluente são altamente dependentes do nível de eficiência dos equipamentos utilizados nos processos de extração (Colin *et al.*, 2007). Segundo Barana (2008), mesmo que o processo de descontaminação do resíduo de manipueira tenha uma eficiência de 90%, os 10% restantes ainda são, algumas vezes, superiores à atividade poluidora do esgoto doméstico.

1.3 Tratamento biológico de efluentes

A produção de compostos químicos que não participam facilmente dos ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre originaram grave problema de poluição para o meio ambiente. A biorremediação, utilização de microrganismos para eliminação de compostos tóxicos, vem sendo muito estudada nos últimos anos. Além de ser de baixo custo, pode resultar na transformação dos contaminantes em produtos finais inócuos ou na sua mineralização (Silva e Coelho, 2006).

O tratamento biológico aeróbio, anaeróbio ou combinado de águas residuárias é uma solução relevante para atenuar o potencial poluidor dos despejos industriais (Sampaio e Santaella, 2002). O oxigênio é utilizado comoceptor de elétrons em sistemas aeróbios, ocorrendo a formação de CO₂ e H₂O. No anaeróbio ocorre à formação de CO₂ e CH₄, o oxigênio molecular está ausente, sendo que, algumas formas de carbono, enxofre e

nitrogênio participam como aceptores de elétrons (ex. NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2) (Freire, *et al.*, 2000).

1.3.1 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia, ou fermentação metanogênica, é produzida por grupos de bactérias fermentativas hidrolíticas, bactérias fermentativas acidogênicas, bactérias acetogênicas e pelas archeas metanogênicas, as quais são as responsáveis pela produção de metano (Chernicharo, 2007). Os principais fatores que afetam o processo de digestão anaeróbia são pH, temperatura, salinidade e substâncias tóxicas inibidoras, assim como a disponibilidade e viabilidade dos nutrientes disponíveis ao microrganismos (Pohland, 1992).

O processo de biodigestão se dá em seis etapas até chegar à geração de biogás: hidrólise de polímeros, fermentação de aminoácidos e açúcares, oxidação dos produtos gerados na fase anterior (ácido e álcoois), oxidação de produtos intermediários (ácidos voláteis), conversão de acetato para metano e conversão de hidrogênio para metano (Chernicharo, 2007). As primeiras etapas da digestão anaeróbia ocorrem em uma ampla faixa de pH, no entanto, a metanogênese só ocorre quando o pH é próximo de 7 (Pohland, 1992). A taxa de produção de metano diminui rapidamente para valores de pH fora da faixa de 6,3 a 7,8 (van Haandel e Lettinga, 1994).

O uso de agentes tamponantes pode contribuir para a estabilidade do processo de digestão anaeróbia, pois aumenta a capacidade do sistema em neutralizar ácidos eventualmente acumulados e em tamponar o pH. O próprio sistema pode produzir efeito de tamponamento, quando há equilíbrio entre dióxido de carbono e íons bicarbonato, oferecendo resistência a mudanças bruscas no pH (Ward *et al.*, 2008). Uma estratégia para o controle do pH é a adição de produtos químicos, como bases fortes, sais de carbonato, e bicarbonato (Guwy *et al.*, 1997).

Entre os produtos que podem ser utilizados para esta finalidade estão os que fornecem alcalinidade de bicarbonato diretamente (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio) e os que reagem com gás carbônico para formar a alcalinidade a bicarbonato (cal hidratada e cal virgem), estes últimos apresentam o inconveniente de aumentar muito o pH quando a quantidade de gás carbônico é insuficiente para reagir com a cal (Chernicharo, 2007). Outras opções de baixo custo que podem ser utilizadas como agentes tamponantes são o calcário ou dolomitos, estes fornecem alcalinidade ao meio na forma de íons de bicarbonatos (HCO_3^-) (Sampaio e Almeida, 2005).

1.3.1.1 Digestão anaeróbia de efluentes de rápida acidificação

Na digestão anaeróbia da vinhaça encontra-se a adição de bicarbonato como fonte direta de alcalinidade, como Ribas-Döll e Foresti (2010), que utilizaram diferentes concentrações de bicarbonato (1,2 a 0,6 $\text{gHCO}_3\text{.gDQO}^{-1}$) para o tratamento da vinhaça utilizando um reator

UASB, em condições mesofílicas, com carga orgânica volumétrica (COV) variando de 0,97 a 5,24 g.L⁻¹.d⁻¹. A eficiência de remoção de matéria orgânica observada foi de 78% e o pH mantido entre 7,0 e 8,0. Outro exemplo é o trabalho realizado por Formagini *et al.* (2010) que utilizaram uréia com o objetivo de elevar o pH da vinhaça durante o tratamento anaeróbico e verificaram que a adição de 0,43 g_{uréia}.gDQO⁻¹ é suficiente para elevar o pH e mantê-lo próximo de 7,0.

No tratamento anaeróbico da manipueira originária de fecularia, em reator UASB (mesofílico) com COV entre 10 e 16 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, Annachhatre & Amatya (2000) utilizaram NaOH para elevar o pH para 7,0. Eles verificaram uma remoção de DQO superior a 80%, com baixos valores de ácidos graxos voláteis (AGV) no efluente e alcalinidade elevada. Colin *et al.* (2006) avaliaram o tratamento da manipueira utilizando um filtro anaeróbico de fluxo horizontal (fluxo tipo pistão) preenchido com bambu, no qual foi aplicada COV máxima de 11,8 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ (DQO de 5 g.L⁻¹) e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 9,5 h. O pH do afluente era de 5,5 e o do efluente entre 7,0 e 8,0. Assim como a estabilização do pH, a remoção de matéria orgânica também foi eficiente, alcançando 87% de remoção de DQO.

No tratamento da manipueira em sistemas separados, Bonifácio *et al.* (1998) estudaram um sistema composto por um reator acidogênico, seguido de um decantador, um tanque neutralizador e reator metanogênico. Utilizando NaOH, o pH do afluente do reator acidogênico era corrigido para 5,5 a 6,0 e entre 7,0 e 8,0 para o afluente do reator metanogênico. A DQO aplicada em ambos os reatores foi de 11 a 18 gDQO.L⁻¹, com TDH de 1 d no reator acidogênico e 4 dias no metanogênico. A remoção máxima de DQO foi em torno de 95%.

1.3.2 Fungos

Os fungos são heterotróficos e obtêm energia degradando material orgânico depositado na natureza e colonizado por eles. Podem também parasitar plantas, animais e ainda outros fungos. Esses organismos secretam enzimas no substrato onde se encontram e absorvem as moléculas resultantes da ação dessas enzimas. Com isso, além de obterem nutrientes para seu crescimento também disponibilizam os produtos resultantes da degradação para ação de outros microrganismos e, por essa razão, são os degradadores primários de material orgânico na natureza (Silva e Coelho, 2006). Dessa forma participam ativamente dos ciclos de carbono, nitrogênio e fósforo, entre outros nutrientes presentes na biosfera (Griffin, 1994; Silva e Coelho, 2006), sobrevivem e crescem em meios com concentrações elevadas de compostos recalcitrantes e são capazes de utilizá-los como fonte de energia (Oliveira *et al.*, 2006 ; Esposito e Azevedo, 2004; Santos e Linardi, 2004; Eggen e Majcherczyk, 1998).

A maioria destes microrganismos é encontrada em habitats com pH entre 4,0 e 9,0, porém algumas espécies têm sido encontradas no ambiente em condições mais extremas de pH (Zak e Wildman, 2004). Em laboratório algumas leveduras e fungos filamentosos crescem

apenas em pH muito baixo ($\text{pH} < 4,0$) ou extremamente elevado ($\text{pH} > 9,0$), enquanto outras espécies podem crescer em ampla faixa de pH de 1,5 a 11 (Leake e Read, 1990; Wheeler *et al.* 1991; Cooke e Whipps, 1993; Kurita e Yamazaki, 2002; Yamanaka, 2003; Gibson e Mitchell, 2005).

O crescimento e as atividades metabólicas dos organismos são uma resposta às condições do ambiente físico-químico que os rodeia. Os fungos filamentosos possuem capacidade de converter matéria orgânica biodegradável em micélio com alto teor de proteína suficiente para ser usado como alimentação animal (Singh, 2006). Desse modo, como todos os organismos vivos, os fungos podem modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio como fontes de energia e base para seu crescimento e reprodução (Galvano e Forchiassin, 2010). De tal modo, determinados elementos são indispensáveis, como carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio e, em menor proporção, fósforo e enxofre, sem os quais não poderiam crescer (Galvano e Forchiassin, 2010).

Alguns fungos utilizam compostos complexos que contêm carbono, que é o macroelemento quantitativamente mais importante do meio de cultivo. Porém, outros são mais seletivos, havendo assim uma ampla gama de compostos de carbono a ser utilizada pelos fungos (Galvano e Forchiassin, 2010). O nitrogênio, constituinte de proteínas e ácidos nucleicos, é obtido por várias espécies de fungos a partir de grande variedade de compostos nitrogenados. Embora amônia e glutamina sejam utilizadas preferencialmente, esses microrganismos também utilizam nitrato, nitrito, purinas, proteínas, aminoácidos, uréia e acetamida como fontes de nitrogênio (Bonatelli, 1977). Para captação e metabolização destas fontes alternativas, é requerida a síntese de enzimas específicas ou ativação de enzimas pré-existentes (Bonatelli, 1977).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados no tratamento biológico, os fungos são hábeis em degradar efluentes tóxicos (Santos e Linardi, 2004; Eggen e Majcherczyk, 1998). Com capacidade de sintetizar enzimas e produzir grande variedade de proteínas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólitos, aliada à versatilidade de adaptação a restrições ambientais severas, têm havido interesse crescente pelo uso destes microrganismos no tratamento biológico (remoção ou destruição) de componentes em águas residuárias com metais, compostos orgânicos e inorgânicos (Coulibaly *et al.*, 2003; Eggen e Majcherczyk, 1998). A capacidade desses fungos em degradar tais substâncias está relacionada ao sistema enzimático inespecífico, capaz de desestabilizar moléculas estáveis quimicamente, além do fato de lançarem enzimas no substrato que colonizam. Desse modo, a utilização destes fungos em processos de biorremediação de materiais, como solos, resíduos e efluentes industriais, contaminados com substâncias recalcitrantes à degradação biológica, têm sido largamente estudadas (Silva e Coelho, 2006).

São muitas as espécies de fungos que são utilizadas em biorremediação. Por exemplo, espécies de zigomicetos degradadores de hidrocarbonetos são *Cunninghamella bainieri*, *C. elegans* e *Syncephalastrum racemosum*. As que promovem oxidações de alcanos são

Absidia spinosa, *Rhizopus stolonifer*, e muitas espécies de *Cunninghamella*. Os fungos basidiomicetos lignocelulolíticos também são utilizados para biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes.

1.3.2.1 Uso de fungos no tratamento de efluentes

A utilização de fungos para tratamento de diversos tipos de efluentes, tanto como pré-tratamento para sistemas anaeróbios quanto em tratamento único, vem sendo estudada desde a década de 60. Martinez-Garcia *et al.* (2009) investigaram a redução de compostos fenólicos e DQO de efluentes da indústria de azeite, usando tratamento com *Candida tropicalis* em reator de batelada a 30°C por 12 dias como uma etapa preliminar ao tratamento anaeróbio, alcançando uma redução de 51 e 62% respectivamente. Para corrigir o pH do efluente após o tratamento fúngico, utilizou-se NaOH, evitando assim problemas na digestão anaeróbia. Gharsallah *et al.* (1999) também utilizaram o tratamento com fungos como uma etapa preliminar à digestão anaeróbia, porém o inóculo utilizado, o fungo da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, removeu 49% da DQO presente no efluente da indústria de oliva e não conseguiu reduzir os compostos aromáticos do meio, não resultando desta forma na descoloração deste. Compostos aromáticos em elevada concentração no efluente, mesmo após o pré-tratamento fúngico, inibiram a biometanogênese na digestão anaeróbia. No entanto, outros fungos foram utilizados com sucesso no pré-tratamento de efluentes da indústria de azeite, como o *Funalia trogii*, relatado por Yesilada *et al.* (1995) que em culturas agitadas removeu 72% dos compostos fenólicos, alcançando 38% de remoção de cor e 40% da DQO, além do *Coriolus versicolor* descrito por Yesilada *et al.* (1998) que extraiu 88% de compostos fenólicos e 50% da DQO presente no efluente, possibilitando assim a ação do consórcio microbiano da digestão anaeróbia.

Manilal *et al.* (1991) usaram biorreatores com cultura mista de *Candida utilis* e *Endomycopsis fibuliger*, para tratar efluentes da indústria de mandioca, resultando na redução de cerca de 94% de DQO e 91% de DBO, com 28h de detenção hidráulica, devido à elevada assimilação tanto de açúcares livres como do amido, demonstrando a eficiência dos fungos como tratamento único para efluentes ricos em carboidratos.

Zhang *et al.* (2005), investigaram o uso de *Candida tropicalis* como inóculo em um reator de recirculação interna com meio suporte cerâmico tipo ôfavo de melão para tratamento de águas residuárias com alto teor de carboidrato, e constataram uma elevada produção de biomassa, resultando em boa remoção de DQO, a qual aumentou significativamente com a adição de uréia ao meio. Zhang *et al.* (2005) verificaram que quando se trata efluentes ricos em carboidratos, o controle do pH do efluente é essencial para criar o ambiente propício para o desenvolvimento fúngico, pois com a fermentação dos carboidratos ocorre a liberação de ácidos orgânicos, que em grande quantidade reduzem o pH abaixo do intervalo ideal 4,5 a 6,5, retardando assim as atividades metabólicas dos fungos.

Elmaleh *et al.* (1996) propuseram tratamento de efluentes altamente acidificados da indústria de alimentos, por *Candida utilis*, o qual foi usado em batelada e contínuo, com pH 3,5 e demonstrou o uso do ácido acético, ácido propiônico ou ácido butírico como única fonte de carbono, resultando na redução de 97% do carbono orgânico total.

1.4 Escopo e Estrutura da Dissertação

Baseado no crescimento espontâneo de fungos em um reator tipo calha anaeróbia de fluxo horizontal tratando manipueira, um efluente que acidifica rapidamente, e considerando a importância desses microrganismos no tratamento de efluentes, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar estes fungos, buscar a melhor condição de desenvolvimento para estes, para o tratamento de efluentes de rápida acidificação e investigar a capacidade de tamponamento destes.

No capítulo 2 são apresentados os resultados dos processos de isolamento e identificação dos fungos desenvolvidos em um reator anaeróbio horizontal tipo calha, o qual tratava manipueira.

O capítulo 3 trata do estudo das condições ambientais (sistema aerado, não aerado e não aerado restrito) para melhor desenvolvimento fúngico a fim de garantir o tratamento de efluentes de rápida acidificação.

O capítulo 4 apresenta os resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia utilizando manipueira pré-tratada por fungos.

As conclusões e recomendações gerais da dissertação são apresentadas no capítulo 5.

1.5 Referências bibliográficas

Annaschhatre A. P., Amatya P. L. (2000). UASB Treatment of tapioca starch wastewater. *Journal of Environmental Engineering*, **126** (12), 1149-1152.

Barana A. C. (2008). Despoluição da manipueira e uso em fertilização do solo. *I Simpósio Nacional sobre a Manipueira*. Palestra. Vitória da Conquista-Bahia. (Palestra durante o I Simpósio Nacional sobre a Manipueira).

Barana A. C. (2000). *Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica*. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP, Brasil.

Barreto A. C. e Campos C. M. M. (2009). Avaliação de um sistema de irrigação autopropelido aplicando água residuária de suinocultura. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, Edição Especial. **33**, 1752-1757.

Berg J. M., Tymoczko J. L. e Stryer L. (2004). *Bioquímica*. 5 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro ó RJ, Brasil.

Biscaro A. F. V. e Florentino H. O. (2008). Modelagem matemática para determinação da eficiência da redução de ST e SV na biodigestão anaeróbia. *Energia na Agricultura*, Botucatu, **23**(3), 1-15.

Bonatelli Jr. R. (1977). *Estabilidade e produção de ácido cítrico em Aspergillus niger*. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo. Campinas - SP, Brasil.

Bonifácio A. L. E., Costa, R. T., Tavares C. R. G. e Bergamasco R. (1998). Tratamento anaeróbio de efluentes líquidos em processo com separação física de fases. In: II Reunião Nacional de Microbiologia aplicada ao Meio Ambiente. Florianópolis ó SC, Brasil.

Braga A. F. M. (2010). *Desenvolvimento de reator anaeróbio para tratamento de efluentes de rápida acidificação*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande - MS, Brasil.

Cereda M. P. (2003). *Caracterização dos substratos da Industrialização da mandioca*. Série cultura de tuberosa amiláceas Latino Americana. v.4. São Paulo: Fundação Gargil. pp.15-37.

Cezar, V. R. S. e Silva Junior S. T. (2008). Cartilha sobre construção e operação de biodigestores alimentados com manipueira. In: *Relatório final do projeto intitulado como Avaliação do tratamento de manipueira de biodigestores de fases separadas (acidogênica e metanogênica) combinado com filtro de macrófitas aquáticas*. Processo 2005.1/002. FAPEAL.

Chernicharo C. A. (2007). *Reatores anaeróbios*. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v.5. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG, Brasil.

Colin X., Farinet J. L., Rojas O. e Alazard D. (2007). Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow with bamboo as support. *Bioresource Technology*, **98**, 1602-1607.

Cooke R. C. e Whipps J. M. (1993). *Ecophysiology of Fungi*. Oxford: Blackwell Scientific, Boston, USA.

Cordeiro G. Q. (2006). *Tratamento de manipueira em reator anaeróbio compartimentado*. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto ó SP, Brasil.

Coulibaly L., Gourene G. e Agathos, N. S. (2003). Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology*. v.2 (12), pp. 620-630.

Eggen T. e Majcherczyk A. (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **41**, 111-117.

Elmaleh S., Defrance M. B., Ghommidh C. e Navarro J. M. (1996) Acidogenic effluents treatment in a yeast reactor. *Water Research*, **30**, 2526-2529.

Esposito E. e Azevedo J. L. (2004). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Educs. Caxias do Sul ó RS, Brasil.

Feiden A. (2001). *Tratamento de águas residuárias de indústrias de fécula de mandioca através de biodigestor anaeróbio com separação de fases em escala piloto*. (Tese de Doutorado). Faculdade de ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu ó SP, Brasil.

Foresti E., Florêncio L., van Haandel A. C., Zaiat M. e Cavalcanti P. F. (1999). Fundamentos do tratamento anaeróbio. In: *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Campos J. R. (ed.), PROSAB, ABES, Rio de Janeiro ó RJ, Brasil.

Formagini E. L., Santos L. S., Paulo P. L. e Boncz M. A. (2010). Methods for stabilization of pH during anaerobic digestion of vinasse: preliminary results obtained with urea dosing. In: *12th world congress on anaerobic digestion*, 2010, Guadalajara, México. Proceedings of 12th world congress on anaerobic digestion. London: IWA. p. 4898-1 - 4898-7.

- Freire R. S., Pelegrini R., Kubota L. T., Durán, N. e Zamora, P. P. (2000). Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v.23 (4), São Paulo.
- Galvano M. A. e Forchiassin F. (2010). *Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2 ed. cap 4. 125p.
- Gharsallah N., Labat M., Aloui F. e Sayadi S. (1999). The effect of *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of olive mill waste waters on anaerobic digestion, *Resour. Conserv. Recycl.* **27**, 187-192.
- Gibson B. R. e Mitchell D. T. (2005). Influence of pH on copper and zinc sensitivity of ericoid mycobionts in vitro. *Mycorrhiza*. **15**, 231-234.
- Griffin D. H. (1994). *Fungal Physiology*. 2 ed., New York: Wiley ó Liss, USA. 458p.
- Guwy A. J., Hawkes F. R., Wilcox S. J. e Hawkes D. L. (1997). Neural network and n-off control of bicarbonate alkalinity in a fluidized-bed anaerobic digester. *Water Research*, **31**(8), 2019-2055.
- Kurita O. e Yamazaki E. (2002). Growth under alkaline conditions of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Current Microbiology*, **45**, 277-280.
- Leake J. R. e Read D. J. (1990). Protease activity in mycorrhizal fungi I. The effect of extracellular pH on the production and activity of protease by ericoid endophytes from soil of contrasted pH. *New Phytologist*, **115**, 243-250.
- Lettinga G. e van Haandel A. C. (1993). Anaerobic digestion for energy production and environmental protection. In: *Renewable energy: sources for fuels and electricity*. Johansson T. B., Kelly H., Reddy A. K. e Williams, R. H. (eds.). Island Press, Washington, D.C., pp. 817-839.
- Leucena M. V. e Chernicharo C. A. L. (2005). Avaliação experimental da compostagem de RSU submetidos a etapa prévia de tratamento anaeróbio. *23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária*. Anais. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, p.09.
- Manilal V. B.; Naraynan C. S.; Balagopan C. (1991). Cassava starch effluent treatment with concomitant scp production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Oxford. **7**: 185-190.
- Martinez-Garcia G., Johnson A. C., Bachamann R. T., Williams C. J., Burgoyne A. e Edyvean R. G. J. (2009). Anaerobic treatment of olive mill wastewater and piggery effluents fermented with *Candida tropicalis*. *Journal of Hazardous Materials*, **164**, 1398-1405.

Matos A.T. (2005). *Tratamento de resíduos Agroindustriais*. Fundação Estadual do Meio Ambiente. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa ó MG, Brasil.

Nitschke M. e Pastore G. M. (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, **97**, 336-341.

Nolasco M. A., Pires E. C. e Springer A. M. (1997). Tratamento aeróbio de efluentes da indústria de celulose e papel visando uma menor produção de lodo biológico. In: *19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Foz do Iguaçu ó PR, Brasil.

Oliveira E. C., *et al.* (2006). Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. In: *Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos*. Recife: Editora Universitária da UFPE, pp. 133-148.

Pawlosky U., Roda L. S. A., Tosin M. e Heisler I. (1991). *Curso de tratamento de efluentes industriais: industrialização de mandioca*. Superintendencia dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente. Curitiba ó PR, Brasil. 126p.

Pereira A. D., Bevilacqua P. D., Bastos R. K. X., Brito G. M. e Sepulveda R. V. (2009). Qualidade microbiológica da biomassa produzida em um sistema de wetlands construídas. In: *25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Recife ó PE, Brasil.

Pohland F. G. (1992). Anaerobic treatment: fundamental concepts, applications and new horizons. In: *Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes*. Pohland F. G. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-34

Ribas-Döll M. M. e Foresti E. (2010). Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, **15** (3), 275-282.

Sampaio J. A. e Almeida S. L. M. (2005). Calcário e Dolomito - comunicação técnica elaborada para edição do livro ó Rochas e Minerais Industriais: Usos e Especificações (capítulo 15), pp. 327 ó 350. <http://www.cetem.gov.br/publicacao/CTs/CT2005-132-00.pdf> (acessado em 30 de maio de 2011).

Sampaio G. M. M. S. e Santaella S. T. (2002). Remoção de DQO em água residuária industrial através de um sistema em escala laboratorial composto por um reator UASB seguido por um filtro biológico com fungos. In: *VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Vitória ó ES, Brasil.

Santaella S. T., Campos J. R. e Elinares, I. L. (1996). Perspectiva de remoção de cor (substâncias húmicas) de águas destinadas ao abastecimento público mediante processo biológico. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. n.1, 14-17.

Santos dos M. B., Miranda de R. M. B., Toledo A. R. C., Cezar V. R. S. (2010). Estudo do tratamento de manipueira em biodigestores anaeróbios de fases separadas. *Simpósio Alagoano de Gestão Ambiental*, Arapiraca-AL, Brasil, UNEAL/Campus I, pp. 91-100.

Santos V. L. e Linardei V. R. (2004). Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents: identification and degradation potential. *Process Biochemistry*. **39**, 1001-1006.

Silva da R. R. e Coelho G. D. (2006). *Fungos - Principais grupos e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de Capacidade de monitores e educadores. São Paulo ó SP, Brasil.

Siqueira L. M., Barros A. R., Amorim E. L., Damianovic M. H., Foresti E. e Silva E. L. (2008). Influence of increasing organic load on the treatment of sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). In: IWA, *IX Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia*. Isla de Pasqua, Chile, 345-351.

Takaya N. (2002). Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **94**, 506-510.

Torres P., Pérez A., Cajigas A. A., Otero A. M. e González M. (2005). Evaluación de diferentes alcalinizantes em el tratamiento anaeróbico de águas fácilmente acidificables. Caso: água residual Del processo de extracción de almidón de yuca. In: IWA, *VIII Taller Y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia*. Punta del Este, Uruguay, 571-575.

van Haandel A. e Lettinga G. (1994). *Tratamento anaeróbico de esgotos: um manual para regiões de clima quente*. EPGRAF. Campina Grande ó PB, Brasil.

van Haandel A. e Marais G. (1999). *O comportamento do Sistema de Lodo Ativado*. Teorias e Aplicações para Projetos e Operação. EPGRAF. Campina Grande ó PB, Brasil.

Vilpoux O. (2003). Processos de produção de fécula de mandioca: comparação Brasil, Tailândia e China. In: Cereda, M. P. e Vilpoux, O. *Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo, Fundação Cargil. pp.142- 175.

Yamanaka T. (2003). The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi in vitro. *Mycologia*. **95**, 5846589.

Yesilada O., Fiskin K. e Yesilada E. (1995). The use of white rot fungus *Funalia trogii* (Malatyia) for the decolourization of phenol removal from olive mill waste water, *Environmental Technologic*. **16**, 956100.

Yesilada O., Sik S. e Sam M. (1998). Biodegradation of olive oil millwastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 37642.

Ward A. J., Hobbs P. J., Holliman P. J. e Jones D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology.* **99**, 7928-7940.

Wheeler K. A., Hurdman B. F. e Pitt J. I., (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicilium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology.* **12**, 1416150.

Zak J. C. e Wildman H. G. (2004). Fungi in stressful environments. In:Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (Eds), *Biodiversity of Fungi*, New York, 3036315.

Zhang Y., Rittmann B. E., Wang J., Sheng Y., Yu J., Shi H., e Qian Y. (2005) High carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. *Process Biochem.* **40**, 8576863.

2

Isolamento e identificação de fungos desenvolvidos em reator anaeróbio de fluxo horizontal tratando manipueira

2.1 Resumo

Em pesquisas realizadas com reator tipo calha anaeróbia de fluxo horizontal operando com uma demanda química de oxigênio (DQO) máxima de 16 g.L^{-1} de um efluente de rápida acidificação (manipueira), houve crescimento espontâneo de fungos na entrada do reator, os quais se desenvolveram em pH moderadamente ácido (4,5), em meio praticamente anaeróbio. Considerando a importância desses microrganismos no biotratamento de efluentes, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar esta comunidade de fungos, com a finalidade de testar, posteriormente, seu potencial de biodegradação. O isolamento das morfoespécies foi realizado e, à medida que as colônias cresceram, foram transferidas, individualmente para placas de Petri. Este procedimento foi repetido até o total isolamento da colônia, obtendo-se 32 isolados. Posteriormente, os isolados foram analisados em microscópio óptico e 28 identificados de acordo com características microscópicas. Entre os fungos encontrados, prevaleceram os gêneros *Aspergillus* sp (11), *Scedosporium* sp (4) e *Paecilomyces* sp (3).

2.2 Introdução

A manipueira é a água de constituição da raiz ou suco celular da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), misturada às águas de lavagem das raízes, que é gerada no momento da prensagem da massa ralada para a fabricação da farinha de mesa ou extração da fécula. Devido ao ácido cianídrico em sua composição (250 mg/kg) e a matéria orgânica (6% de sólidos dissolvidos) que contém (Cereda, 1994), a manipueira torna-se um transtorno, quando não tem um destino adequado, pelo risco de poluição ao ambiente.

Muitos efluentes da agroindústria, como a manipueira, sofrem acidificação rápida, ou possuem componentes tóxicos. Apesar de a grande maioria das indústrias modernas adotarem alguma forma de tratamento para seus efluentes, os requerimentos legais relativos ao gerenciamento dos resíduos industriais têm se tornado mais restritivos, fazendo-se necessário investigar alternativas para melhorar os processos de tratamento e a disposição final desses rejeitos (Kunz *et al.*, 2002).

Os microrganismos envolvidos em processos de biorremediação são fungos, protozoários, rotíferos, algas e bactérias, desta forma, um reator biológico pode englobar populações mistas de organismos (Metcalf e Eddy, 1991). Fungos e bactérias são os principais agentes decompositores presentes na natureza. Contudo, os fungos apresentam como vantagem a capacidade de produção de inúmeras enzimas como lactase, proteases, ligninases, lipases, celulasas, as quais podem atuar sobre determinado poluente orgânico, tornando-o mais acessível à biodegradação (Bumpus *et al.*, 1985).

Os fungos têm sido utilizados para tratamento de ampla variedade de resíduos e efluentes, como lignina, clorofenóis, efluentes das indústrias de papel, óleo, farinha, batata, têxtil entre outros, bem como tem sido estabelecido seu papel na biorremediação de vários compostos e sedimentos perigosos e tóxicos ao solo (Singh, 2006). A capacidade dos fungos em sintetizar enzimas e produzir muitas proteínas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólitos, aliada à sua versatilidade de adaptação a restrições ambientais severas, têm atraído interesse crescente pelo uso destes microrganismos no tratamento biológico de componentes em águas residuárias com metais, compostos orgânicos e inorgânicos (Coulibaly *et al.*, 2003).

O gênero *Aspergillus*, vem se mostrando eficiente no tratamento de diversos tipos de efluentes em experimentos realizados em escala de laboratório (Coulibaly *et al.*, 2003), como por exemplo na remoção de corantes têxteis que são compostos químicos de difícil degradação e ação poluidora potente (Robles *et al.*, 2000). *Penicillium*, é usado em tratamento de efluentes com alto teor de gordura devido à capacidade de produzir lipase (Leal *et al.*, 2000) e assim como o *Paecilomyces*, e *Acremonium*, também é utilizado na degradação de poluentes industriais, como corantes (Silva *et al.*, 2000). O *Fusarium*, é

Capítulo 2- Isolamento e identificação de fungos desenvolvidos em reator anaeróbio de fluxo horizontal tratando manípueira

responsável pela biodegradação de fenol em efluentes (Cai *et al.*, 2007), já o *Scedosporium* sp. é usado em biofiltros, devido à capacidade em degradar tolueno (Garcia-Peña *et al.*, 2001). Espécies de *Cladosporium* são capazes de degradar diferentes azocorantes, ácido tânico e diversos substratos fenólicos naturais, dessa forma sendo usado no tratamento de efluentes sucroalcooleiros (Perovano Filho *et al.*, 2007).

Observou-se o crescimento de fungos na entrada de reator anaeróbio tipo calha de fluxo horizontal em pesquisa para tratamento de efluente de fecularia, realizada na Departamento de Hidráulica e Transporte (DHT) da UFMS. Estes fungos se desenvolveram em condições ácidas (pH em torno de 4,5) e meio praticamente anaeróbio (Oliveira, 2007). Desta forma o objetivo deste trabalho foi a identificação da comunidade de fungos desenvolvida nesse reator para indicação de espécies capazes de degradar matéria orgânica em condições ácidas.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Isolamento

Os experimentos com o isolamento e identificação dos fungos foram realizados no Laboratório de Biologia Geral do Departamento de Biologia da UFMS (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul). O inóculo utilizado foi coletado após 200 dias de experimento com reator anaeróbio tipo calha de fluxo horizontal, preenchido com pedras de calcário, empregado em pesquisas no Departamento de Hidráulica e Transporte da UFMS (Figura 2.1).

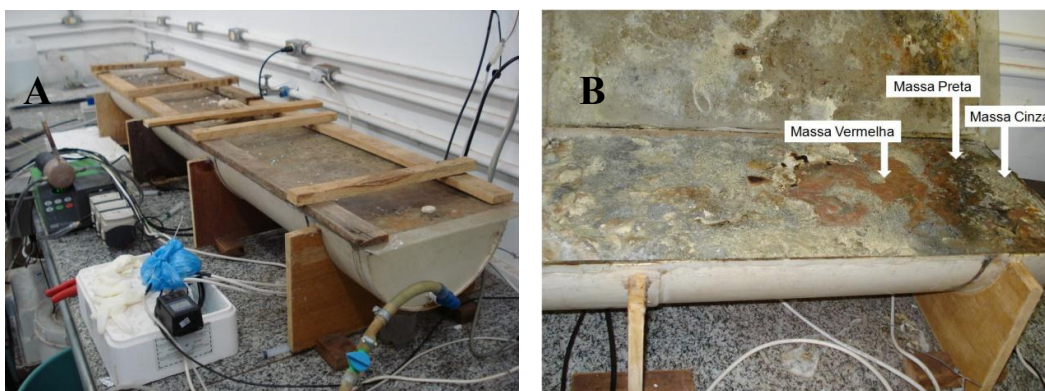


Figura 2-1: Fotos do reator anaeróbio tipo calha de fluxo horizontal: A ó Fechado; B ó Aberto com o detalhamento do local de retirada dos fungos

O reator era utilizado para tratamento de manípueira operando com uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) em torno de 16 g.L^{-1} , $25^\circ\text{C} \pm 1$ e pH 4,5. Porções do lodo coletado na parte inicial do reator, com aproximadamente 60 g foram separadas em seis porções de 10 g cada e transferidas para erlenmeyers, adicionando-se uma gota de solução

Tween 80 e água destilada estéril até completar 100 g. As seis amostras foram então submetidas à agitação orbital, a 28°C por 24 horas. Após filtragem em lã de vidro as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 RPM (Rotação Por Minuto) e os esporos obtidos foram ressuspensos em 10 ml de solução salina. Foram feitas diluições de acordo com as concentrações de esporos após a avaliação destas em Câmara de Neubauer e então alíquotas foram semeadas em placas de Petri com meio Batata Dextrose Ágar (BDA). O meio BDA foi preparado pela infusão de 200 g de batata em 500 ml de água destilada, 20 g de glicose e 15 g de ágar acrescidos de cloranfenicol, para inibição de crescimento bacteriano (Araújo *et al.*, 2002), com o ajuste do pH para 5,5 quando necessário.

As placas foram incubadas em estufa a 28°C e observadas diariamente. À medida que as colônias cresceram, foram transferidas isoladamente para outra placa de Petri, com o mesmo meio de cultura e incubadas novamente nas mesmas condições. Este procedimento foi repetido até o total isolamento das colônias.

Após o isolamento, com o objetivo de proporcionar melhores condições ao desenvolvimento dos fungos, foi testado meio de cultura à base de mandioca, em substituição à batata, pois originalmente o lodo se desenvolveu em um reator tratando efluente resultante do processo industrial da farinha de mandioca (manipueira). O meio de cultura à base de mandioca (MDA), foi elaborado pela infusão de 200 g de mandioca em 500 ml de água destilada, 20 g de glicose, 15 g de ágar e 5 g de meio extrato de carne para enriquecer o meio, acrescidos de cloranfenicol e, para a melhor reprodução do ambiente de onde foram coletados, o pH foi ajustado para 4,5. Os fungos foram semeados nos dois meios, incubados em estufa a 28°C

2.3.2 Identificação

Os isolados fúngicos foram observados, descritos e agrupados de acordo com suas características macroscópicas, como forma da colônia, pigmentação, superfície, taxa de crescimento. Posteriormente, para a identificação das morfoespécies, fragmentos das colônias foram preparados com técnica de microcultivo em lamínulas (Riddell, 1950), e corados com azul de algodão. Foram analisadas ao microscópio óptico, quanto às estruturas reprodutivas, morfologia das hifas e estruturas de resistência. Utilizaram-se chaves para a identificação dos gêneros e quando possível, de espécie (Raper *et al.*, 1949; Booth, 1971; Ellis, 1971; Raper e Fennel, 1977; Pitt, 1988).

Após a identificação, o diâmetro das colônias fúngicas foi medido a cada dois dias com o intuito de estimar o tempo de crescimento para estas diferentes colônias.

2.4 Resultados e Discussão

Após sete dias de observação e comparação do diâmetro das colônias, nos meios BDA e MDA, foi constatado que tiveram melhor desempenho no meio de mandioca. A partir de então este foi o meio de cultura utilizado.

Na Tabela 2.1 estão apresentadas as características dos fungos identificados. Foram obtidas 32 morfoespécies, das quais quatro não foram identificadas. Entre as 28 restantes 3 foram identificadas em nível de espécie, do restante foi identificado somente o gênero foi identificado. Destes, 11 eram *Aspergillus* sp, 4 eram *Scedosporium* sp e 3 eram *Paecilomyces* sp. Considerando que estes fungos foram cultivados em condições físicas e nutricionais idênticas, as variações morfológicas encontradas representam características distintivas das espécies isoladas.

Tabela 2-1: Classificação dos fungos e suas características macroscópicas.

*Morfo espécie	Cor da Colônia	Presença de micélio aéreo	Cor do Meio	Cor do fundo do meio	Textura da superfície da colônia	Crescimento da colônia**	Nome
P1	cinza claro	escasso	cor de MDA	centro cinza e branco ao redor	cotonoso	***7cm/7cm	<i>Scedosporium</i>
P2	branco com partes laranja	escasso	cor de MDA	creme	lanoso	7cm/7cm	<i>Neurospora crassa</i>
C a	centro marrom e amarelo claro ao redor	escasso	cor de MDA	marrom e amarelo ao redor	fibroso com grânulos	2cm/2cm	<i>Aspergillus</i>
Ca.1	centro marrom e amarelo claro ao redor	escasso	amarelo queimado	vinho	fibroso com grânulos	3cm/3cm	<i>Aspergillus</i>
C1	centro marrom e branco ao redor	escasso	cor de MDA	centro marrom e creme ao redor	fibroso	7cm/7cm	<i>Eupenicillium</i>
C3	centro creme e branco ao redor	mediano	cor de MDA	marrom com branco ao redor	lanoso	5,6cm/5,4cm	<i>Aspergillus</i>
C7	dois tons de amarelo	mediano	amarelado	amarelo queimado	fibroso com grânulos	1,2cm/1,2cm	<i>Aspergillus</i>
C8	centro amarelo claro e branco ao redor	escasso	amarelo	avermelhado com amarelo ao redor	lanoso	5,4cm/4,6cm	<i>Aspergillus</i>
C11	dois tons de amarelo	mediano	cor de MDA	amarelo claro e amarelo queimado	lanoso	7cm/7cm	<i>Aspergillus</i>

Capítulo 2- Isolamento e identificação de fungos desenvolvidos em reator anaeróbio de fluxo horizontal tratando manuseira

*Morfo espécie	Cor da Colônia	Presença de micélio aéreo	Cor do Meio	Cor do fundo do meio	Textura da superfície da colônia	Crescimento da colônia**	Nome
C12	centro marrom claro e amarelo ao redor	escasso	cor de MDA	amarelo queimado	granular fino	3,8cm/4cm	Não identificado
C13	Amarelado	escasso	cor de MDA	dois tons de rosa	granular fino	7cm/6,6cm	<i>Acremonium</i>
C14	Branco	mediano	cor de MDA	bege	lanoso	6cm/7cm	<i>Paecilomyces</i>
C17	centro marrom e amarelo ao redor	escasso	cor de MDA	amarelo queimado	granular fino	6cm/7cm	<i>Aspergillus</i>
C21	Bege	escasso	cor de MDA	bege	granular fino	7cm/7cm	<i>Paecilomyces</i>
C24	centro marrom claro e branco ao redor	escasso	cor de MDA	centro marrom e creme ao redor	fibroso	7cm/7cm	<i>Eupenicillium</i>
C25	Branco	mediano	cor de MDA	bege	lanoso	7cm/7cm	Não identificado
C25.1	Rosa	escasso	cor de MDA	dois tons de rosa	granular fino	7cm/7cm	<i>Fusarium oxysporum</i>
C28	Creme	escasso	amarelo	marrom com branco ao redor	lanoso	5,5cm/3,2cm	<i>Aspergillus</i>
C29	cinza claro	escasso	cor de MDA	centro cinza e branco ao redor	cotonoso	7cm/7cm	<i>Scedosporium</i>
C41	branco com bolinhas esverdeadas	mediano	cor de MDA	amarelo	fibroso com granulos	7cm/7cm	Não identificado
C42	branco com bolinhas esverdeadas	mediano	cor de MDA	marrom claro misturado com bege e vinho	fibroso com granulos	7cm/7cm	<i>Emericella</i>
C46	cinza claro	escasso	cor de MDA	centro cinza e branco ao redor	cotonoso	7cm/7cm	<i>Scedosporium</i>
V1	Branco	escasso	cor de MDA	creme	lanoso	7cm/7cm	<i>Curvularia</i>
V2	cinza claro	escasso	cor de MDA	centro cinza e branco ao redor	lanoso	7cm/6,8cm	<i>Scedosporium</i>
V3	Branco	Muito	cor de MDA	creme	cotonoso	7cm/7cm	Não identificado
V4	Verde	escasso	cor de MDA	centro marrom claro e verde ao redor	lanoso	7cm/7cm	<i>Penicillium</i>
V5	verde com tufo branco	mediano	cor de MDA	amarelo	lanoso	6cm/6,6cm	<i>Penicillium</i>

Capítulo 2- Isolamento e identificação de fungos desenvolvidos em reator anaeróbio de fluxo horizontal tratando manupueira

*Morfo espécie	Cor da Colônia	Presença de micélio aéreo	Cor do Meio	Cor do fundo do meio	Textura da superfície da colônia	Crescimento da colônia**	Nome
V31	cinza escuro	escasso	amarelo	centro preto com branco ao redor	cotonoso	7cm/7cm	<i>Cladosporium</i>
V32	amarelo com manchas verdes	escasso	cor de MDA	marrom claro	granular	5cm/4,6cm	<i>Aspergillus</i>
C47	Branco	escasso	cor de MDA	creme	granular fino	5,7cm/5,5cm	<i>Paecilomyces</i>
C48	marrom claro	escasso	cor de MDA	amarelo queimado	granular fino	7cm/6cm	<i>Aspergillus terreus</i>
C49	marrom no centro e amarelo ao redor	mediano	cor de MDA	marrom no centro e amarelo queimado ao redor	granular fino	2,6cm/2,4cm	<i>Aspergillus</i>

*Cor do lodo no reator: C- cinza; P- preto e V- vermelho;

**Placas de Petri com cerca de 7 cm de diâmetro;

*** Medida perpendicular dos diâmetros das colônias.

O isolamento e caracterização de microrganismos são pré-requisitos importantes para melhor conhecimento e otimização do processo de despoluição do ambiente, utilizando a habilidade natural de microrganismos em quebrar, transformar, mineralizar ou até mesmo combinar compostos poluentes com outras moléculas (Silva e Coelho, 2006). Esses microrganismos transformam o poluente em biomassa, água, dióxido de carbono e outros componentes menos tóxicos (Caprez *et al.*, 2002). Velmurungan *et al.* (2010) isolou e identificou fungos retirados de uma amostra de solo contaminado por chumbo e cianeto. Posteriormente estes fungos foram usados com sucesso no processo de biossorção de chumbo em soluções aquosas. *Aspergillus Niger* originado em águas residuárias de indústria de ácido cítrico demonstrou eficiência na adsorção de chumbo em soluções aquosas (Jianlong *et al.*, 2001).

Algumas espécies de *Penicillium* são conhecidas pela remoção de metais de efluentes, como *Penicillium simplicissimum* que no processo de adsorção de zinco, também produz ácido cítrico, acoplado valor econômico ao tratamento de efluentes por este fungo (Franz *et al.*, 1991). Zhang *et al.* (2002) verificou que o *Penicillium janthinellum* é capaz de reduzir a toxicidade do alumínio em efluentes, de acordo com Singh (2006) os mecanismos de transformação dos fungos são redução, metilação e desequilíbrio de metais. *Paecilomyces sp.* é utilizado na remoção de cor de efluentes da indústria de papel, através da degradação de lignina relacionada a compostos fenólicos (Singh, 2006). *Paecilomyces* junto a outros fungos terrestres como *Acremonium*, *Graphium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* e membros da *Sphaeropsidales*, são capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo (Singh, 2006).

Embora o amido seja uma fonte de carbono pobre quando comparado com a glicose para o desenvolvimento fúngico, Jiff *et al.* (1998), apresentou uma investigação onde revelou que *Aspergillus orizae* utilizou águas residuárias de amido como fonte de carbono e energia para seu metabolismo. Considerando a manipueira como um efluente industrial rico em carboidratos e com pH levemente ácido, este pode ser indicado como um bom substrato para o crescimento e sobrevivência dos fungos isolados, se enquadrando na comunidade de microrganismos que possam ser utilizados para o tratamento de efluentes. Desta forma, este trabalho de identificação constitui-se de uma etapa preliminar, que visa o uso destes fungos no tratamento de efluentes industriais com baixo custo.

2.5 Conclusões

Os fungos retirados do reator horizontal tipo calha foram isolados em 32 morfoespécies, das quais quatro não foram identificadas. Entre as 28 restantes apenas 10,71% foram identificadas em nível de espécie, o restante foi identificado somente o gênero. Destes, 11 eram *Aspergillus* sp, 4 eram *Scedosporium* sp e 3 eram *Paecilomyces* sp.

2.6 Referências bibliográficas

- Araújo W. L., Lima A. O. S., Azevedo J. L., Marcon J., Sobral J. K. e Lacava P. T. (2002). Isolamento de Microrganismos Endofíticos. Universidade de São Paulo. Piracicaba- Brasil.
- Bitton G. (1994). *Wastewater microbiology*. New York- USA, pp. 29-31.
- Booth C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Surrey.
- Bumpus J. A., Tien M., Wright D. e Aust S. D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. *Science*. **228**, 1434-1436.
- Cai W., Li J. e Zhang Z. (2007). The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *Journal of hazardous materials*, **148** (1-2), 38-42.
- Caprez M. A. C, Borges A. L. N, Bispo M. G. e Pereira D. (2002). Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo, *Ciência Hoje*, **30**, 32-37.
- Cereda M. P. (1994). Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: *Resíduos da industrialização da mandioca*. pp. 11 - 50.
- Conceição D. M., Angelis D. A., Bidoia E. D. e Angelis D. F. (2005). *Fungos Filamentosos Isolados do Rio Atibaia, SP e Refinaria de Petróleo Biodegradadores de Compostos Fenólicos*. Arq. Inst. Biol., São Paulo-SP, Brasil, v.72, n.1, pp. 99-106.
- Coulibaly L, Gourene G. e Agathos N. S. (2003). Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology*, **2** (12), 620-630.
- Ellis M. B. (1971). *Dematiaceus Hyphomycetes*. CAB Press, London-England, 608p.
- Franz, A., Burgstaller W. e Schinner F. (1991) Leaching with *Penicillium simplicissimum*: influence of metals and buffers on proton extrusion and citric acid production. *Appl. Environmental Microbiology*. **57**: 7696774.
- Garcia-Peña E. I., Hernández S., Favela-Torres E., Auria R. e Revah S. (2001). Toluene biofiltration by fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnology and Bioengineering*, v.76, n.1, pp.61-69.
- Jianlong W., Xinmin Z., Decai D. e Ding Z. (2001). Bioadsorption of lead(II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*. **87**, 273-277.
- Jiff B., Van Leeuwenh H. J., Patel B. e Yu Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, **66**, 201-206.
- Kunz A. e Peralta-Zamora P. G. (2002). Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v. 25, n. 01, pp. 78-82.

Capítulo 2- Isolamento e identificação de fungos desenvolvidos em reator anaeróbio de fluxo horizontal tratando manípueira

Leal M. C. R. C., Freire D. M. G., Cammarota M. C. e Sant'Anna Jr G. L. (2000). *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*. (Dissertação de Mestrado). Programa de Engenharia Química da COPPE, UFRJ. Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Metcalf e Eddy. (1991). *Wastewaters Engineering-Treatment, disposal, reuse*. New York: Mc Graw-Hill. 822p.

Oliveira K. R. F. de. (2007). *Processos ecotecnológicos no tratamento de efluentes líquidos de fecularia*. (Dissertação de Mestrado) ó Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS, Brasil.

Perovano Filho N., Silva K. F. S. e Lopez A. M. Q. (2007). *Fenoloxidasas de fungos como marcadores para seleção de biosuplementadores no tratamento de efluentes sucroalcooleiros*. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Instituto de Química e Biotecnologia. UFA. Maceió-AL, Brasil.

Pitt J. I. (1988). *A laboratoty guide to common Penicillium species*. 2 ed. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, North Ryde. pp. 115-116.

Rapper K. B., Thom C. e Fennell D. I. (1949). *A manual of the penicillia*. William & Winkins Company, Baltimore, USA.

Rapper K. B. e Fennell D. I. (1977). *The genus Aspergillus*. Williams & Wikins Company, Florida, USA.

Riddel R. W. (1950). Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. In: *Mycologia*, v. 42, pp. 265-270.

Robles A., Lucas R., de Cienfuegos G. A. e Galvez, A. (2000). Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresource Technology*, **74**, 217-221.

Rodrigues K. de A. (1999). *Tratamento biológico de água residuária sintética de laticínios por decomposição fúngica*. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará, Brasil.

Santaella S. T., Campos J. R. e Elinares I. L. (1996). Perspectiva de remoção de cor (substâncias húmicas) de águas destinadas ao abastecimento público mediante processo biológico. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, n.1, 14-17.

Santaella S. T., Leitão R. C., Menezes E. A, Silva F. J. A. da, Aragão K. da S. e Giffone D. A. (2002). Emprego de fungos para tratamento biológico dos efluentes da indústria de beneficiamento de castanha de caju. *VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Vitória-ES, Brasil.

Capítulo 2- Isolamento e identificação de fungos desenvolvidos em reator anaeróbio de fluxo horizontal tratando manípueira

Santaella S. T., Silva J. F. das C. G., Gadella D. de A. C., Costa K. O., Aguiar de R., Arthaud I. D. B. e Leitão R. C. (2009). Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, **14** (1), 139-148.

Silva da R. R. e Coelho G. D. (2006). *Fungos. Principais grupos e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de Capacidade de monitores e educadores. São Paulo-SP, Brasil.

Silva J. H. e Monteiro R. T. R. (2000). Degradação de Xenobióticos por Fungos Filamentosos Isolados de Areia Fenólica. *R. Bras. Ci. Solo*, **24**, 669-674.

Singh H. (2006). *Mycorremediation*. New Jersey: John Wiley & Sons. Velmurungan N, Hwang G, Sathishkumar M, Choi T. K, Lee K. J, Oh B. T e Lee Y. S. (2010). Isolation, identification, Pb(II) biosorption isotherms and kinetics of a lead adsorbing *Penicillium* sp. MRF-1 from South Korean mine soil. *Journal of Environmental Sciences*, **22** (7), 1049-1056.

Zhang J. N., Liu N., Yang Y.Y., Luo S.Z., Jin T.M., Liao J.L. e Hua X.F. (2002) Biosorption of Am-241 by *Rhizopus arrhizus*: preliminary investigation and evaluation. *Appl. Radiat. Isot.* **57**: 1396-1403.

3

Uso de fungos para o tratamento da manipueira

3.1 Resumo

Um conjunto micelial de fungos, que se desenvolveu naturalmente em um reator de fluxo horizontal tratando manipueira (pH 4,5), previamente isolado e identificado, foi utilizado buscando uma alternativa para o tratamento de efluentes de rápida acidificação. A capacidade em degradar matéria orgânica e elevar o pH do meio foram testadas em três diferentes ambientes: aerado (AE), não aerado (NAE) e não aerado restrito (NAER), em concentrações baixa ($1,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$), média ($7,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$) e alta (15 gDQO.L^{-1}), com e sem meio suporte. A cultura mista de fungos mostrou habilidade em biodegradar manipueira com um pH inicial de 4,5 e DQO de 15 gDQO.L^{-1} , elevando o pH para valores acima de 8,5, em 27 d, com 13% de DQO remanescente, em ambas condições, aerada e não aerada. A condição NAER não foi adequada para o tratamento de efluentes, pois levou 75 dias para remover 85% da matéria orgânica presente no meio. Os resultados indicaram que a concentração inicial de compostos de nitrogênio no meio tem papel importante no tamponamento do sistema. A espuma de poliuretano usada como meio suporte, não foi eficiente, tendo em vista que não ocorreu aderência expressiva de biomassa fúngica no mesmo. Concluiu-se que a cultura mista de fungos estudada foi eficiente no tratamento de manipueira e poderia ser aplicada, tanto como tratamento único, utilizando a condição aerada, quanto como uma etapa preliminar à digestão anaeróbia, utilizando a condição não aerada, tornando o pH do meio adequado ao consórcio microbiano do tratamento anaeróbio, viabilizando assim a produção de metano.

3.2 Introdução

A manipueira é o efluente resultante do processo de industrialização da mandioca com alto teor de matéria orgânica, devido à presença de carboidratos, açúcares solúveis, matérias graxas e mucopolissacarídeos. Também possui um b-glicosídeo chamado linamarina, que é facilmente hidrolisado a cianeto, composto altamente tóxico ao metabolismo de seres vivos (Cordeiro, 2006). Efluentes agroindustriais como a manipueira, sofrem fermentação rapidamente, especialmente a glicose (Berg *et al.* 2004) e são conhecidos como efluentes de rápida acidificação.

Segundo von Sperling (2005), o melhor método para a decomposição do material destes efluentes é o processo biológico, o qual requer a manutenção de condições ambientais favoráveis, como temperatura, pH e tempo de contato, entre outros. No entanto, estes efluentes são geralmente tratados em sistemas de baixa tecnologia, como lagoas anaeróbias (Boncz *et al.* 2008) ou aplicados na fertirrigação de solos, com potencial de alteração de sua composição físico-química e contaminação do lençol freático (Silva *et al.*, 2007; Fioretto, 2000). Outra opção de tratamento que vem sendo estudada é a digestão anaeróbia da manipueira em reatores de fase única ou de duas fases.

Annachhatre e Amatya (2000) utilizaram um reator UASB e adicionaram NaOH para manter o pH em 7,0 durante o processo de tratamento, com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 1 d. Bonifácio *et al.* (1998) também usaram NaOH, mas optaram por um sistema de duas fases, com TDH de 1 d para o reator acidogênico e 4 ds para o reator metanogênico. Colin *et al.* (2006) estudaram um filtro anaeróbio de fluxo horizontal preenchido com bambu, sem adição de alcalinizantes, com um TDH de 9,5 h. Todos alcançaram estabilização do pH no sistema e remoções de matéria orgânica acima de 80% para cargas orgânicas volumétricas variando de 4,6 a 16 gDQO.L⁻¹.d¹. No entanto, em uma ampla revisão de literatura, não foram encontradas publicações de experiências em escala real, que validassem as experiências em bancada, indicando que ainda não existe uma solução simples e eficiente para o tratamento de efluentes de rápida acidificação.

Entre os microrganismos que também podem ser utilizados no tratamento biológico, estão os fungos, que possuem habilidade em suportar possíveis choques nas cargas orgânica e hidráulica a eles submetidas, intensas e bruscas variações no pH, luz e umidade (Coulibaly *et al.*, 2003). Além disso, produzem enzimas e uma grande variedade de proteínas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólitos e adaptam-se às mais variadas concentrações de oxigênio. Embora a maioria dos fungos cresça em condições aeróbias, gerando ATP através da respiração de oxigênio, eles expressam duas vias alternativas de redução do nitrato em resposta à pressão parcial de oxigênio do ambiente, quando o suprimento deste é insuficiente (Takaya, 2002). Alguns microbiologistas acreditam na existência de fungos anaeróbios, porém isto tem causado divergências entre membros desta classe. Liggenstoffer *et al.* (2010) confirmou a presença de fungos anaeróbios no aparelho

digestivo de mamíferos, porém, Kerstin Voigt especialista em filogenética de fungos, questiona a aceitação destes fungos, pois acredita que tenham sido classificados erroneamente (Ebersberger *et al.* 2010), onde algumas disposições de genes estão mal rotuladas dificultando a classificação morfológica destes fungos (Griffith *et al.* 2010), sendo ainda muito questionável a existência de fungos com metabolismo obrigatoriamente anaeróbio.

Em pesquisas anteriores, onde se estudou o tratamento de manipueira em um reator anaeróbio de fluxo horizontal (coberto-não vedado), preenchido com pedras de calcário (passadas na peneira ABNT 11/2 (38,1mm) e retidas na peneira ABNT 1 (24,5mm)), foi observado o crescimento de fungos na entrada do reator, em um ambiente ácido (pH 4,5) e, provavelmente, micro-aeróbio (Oliveira, 2007). Após o isolamento e a identificação dos fungos (Capítulo 2), foram realizados alguns testes preliminares, a fim de avaliar o papel dos fungos crescidos espontaneamente, na degradação da manipueira. Foi observado em testes preliminares que, além da degradação da matéria orgânica, a biomassa fúngica foi capaz de elevar o pH do meio a níveis elevados. Estes resultados preliminares, aliados à habilidade que os fungos têm em modificar e utilizar o ambiente a seu favor (Galvano e Forchiassin, 2010), e ao grande número de estudos já existentes sobre a utilização destes em processos de biorremediação de materiais contaminados com substâncias recalcitrantes (Silva e Coelho, 2006), neste trabalho estudou-se o potencial da cultura mista de fungos que se desenvolveu em um reator tratando efluente de rápida acidificação.

O objetivo deste trabalho foi verificar o desempenho de fungos em três diferentes condições (aerado, não aerado e não aerado restrito) com e sem meio suporte e com diferentes concentrações de DQO inicial. Avaliando dessa forma, o seu desenvolvimento e buscando assim a melhor condição para ser utilizada no tratamento de efluentes de rápida acidificação.

3.3 Material e Métodos

O experimento foi composto de dois testes. No teste preliminar foi observado o crescimento de fungos na manipueira e o comportamento do pH deste efluente após a inoculação dos fungos. Posteriormente foram realizados testes de biodegradabilidade em diferentes condições de meio (Aerado, Não aerado e não aerado restrito), com e sem meio suporte, utilizando três diferentes concentrações de manipueira (15, 7 e 1,5 gDQO.L⁻¹), e um substrato sintético (1 gDQO.L⁻¹).

3.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram coletados após 200 d de experimento com reator tipo calha, o qual tratava efluente de fecularia em condições ácidas e meio praticamente anaeróbio (Oliveira *et al.*, 2007), os fungos foram isolados e identificados do lodo coletado

(Capítulo 2), semeados em meio Mandioca Dextrose Agar (MDA - Himedia Laboratories PVT- Mumbai, Índia), com pH em torno de 4,5 e incubados a 30°C .

3.3.2 Efluente de Rápida Acidificação

Utilizou-se manipueira, proveniente de uma farinheira com produção artesanal localizada no município de Sidrolândia ó MS. O efluente foi coletado na caixa de retenção, localizado abaixo das prensas de massa ralada e transportado durante 1:30 hrs até o laboratório de efluentes do DHT/CCET/UFMS em Campo Grande, onde permaneceu em decantação por 2 hrs. A decantação foi adotada, tanto para a remoção de areia e outros materiais indesejáveis (Sampaio, 1996) como para a decantação e separação do amido residual (Ribas, 2003). O sobrenadante foi homogeneizado, transferido para garrafas de politereftalato de etileno (PET) e armazenados imediatamente a -18°C.

3.3.3 Substrato Sintético

Como a glicose é o carboidrato de melhor e mais fácil assimilação pelos fungos foi usada junto a uma solução de nutrientes, contendo: NH_4Cl (0,28 g.L^{-1}), K_2HPO_4 (0,25 g.L^{-1}), $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g.L^{-1}), $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g.L^{-1}) e CaCO_3 (0,6 g.L^{-1}) para o preparo de uma solução de açúcar ideal para o crescimento de fungos, na concentração de 1 gDQO.L^{-1} , para ser empregada como controle, no experimento em batelada.

3.3.4 Caracterização da Manipueira

Antes de dar início aos experimentos, foram determinados: condutividade elétrica, salinidade, DQO, cálcio, dureza, NT, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, NO_3^- , S^{2-} , SO_4^{2-} , sólidos totais, sólidos voláteis totais, sólidos fixos totais, pH, turbidez, alcalinidade, acidez volátil, óleos e graxas, da manipueira, para sua caracterização .

3.3.5 Teste Preliminar

O teste foi realizado em placas de Petri descartáveis com o diâmetro de 100x20 mm. Foram depositados 35 ml de manipueira (22 gDQO.L^{-1}) e/ou meio MDA (96 gDQO.L^{-1}) e/ou água estéril em cada placa. Todos os fungos foram semeados em quantidades iguais em todas as placas. O experimento foi realizado em duplicata, empregando seis placas no total. Para eliminar outros microrganismos que poderiam interferir no teste, a manipueira e a água foram esterilizadas a 121°C por 15 min, assim como a alça e o perfurador, utilizados para semear os fungos nos meios. A inoculação da cultura mista de fungos foi realizada em câmara de fluxo UV (Labconco Corporation- Kansas City, Missouri). Posteriormente as placas foram vedadas com filme de PVC e incubadas em estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. O teste teve duração de 10 dias baseado em experimentos anteriores, nos quais os diâmetros das colônias fúngicas foram medidos a cada dois dias para avaliação da taxa de crescimento.

Após o experimento foi feita a identificação dos fungos predominantes por análises ao microscópio óptico.

3.3.6 Teste de biodegradabilidade

O experimento de biodegradabilidade foi realizado em erlenmeyers de 500 ml. Foram utilizadas três concentrações de manipueira (15,0; 7,0 e 1,5 gDQO.L⁻¹) e glicose com 1 gDQO.L⁻¹, em três condições de meio: aerado (AE), não aerado (NAE), e não aerado restrito (NAER) com e sem meio suporte (+). A manipueira com concentração inicial de 81,1 gDQO.L⁻¹ foi diluída com água destilada até as concentrações desejadas e distribuída nos erlenmeyers. Cada erlenmeyer foi preenchido com 450 ml de efluente. Para a condição de meio aerado foi utilizada uma bomba de aquário conectada a mangueiras, em cujas extremidades havia pedras porosas nas pontas para proporcionar distribuição melhor do ar (figura 3.1 - A).

Logo após a inoculação dos fungos, os erlenmeyers foram fechados com tampões de algodão e gaze, a fim de garantir a troca de gases com o meio. Para as condições de meio não aerado restrito foi realizada a troca de fase gasosa com mistura gasosa de N₂/CO₂ (70/30) (White Martins, Campo Grande-MS), a fim de retirar o oxigênio presente no meio e, posteriormente, os frascos foram vedados com parafilme. No meio não aerado, os erlenmeyers foram apenas vedados com parafilme (Figura 3.1 - B), sem troca gasosa.

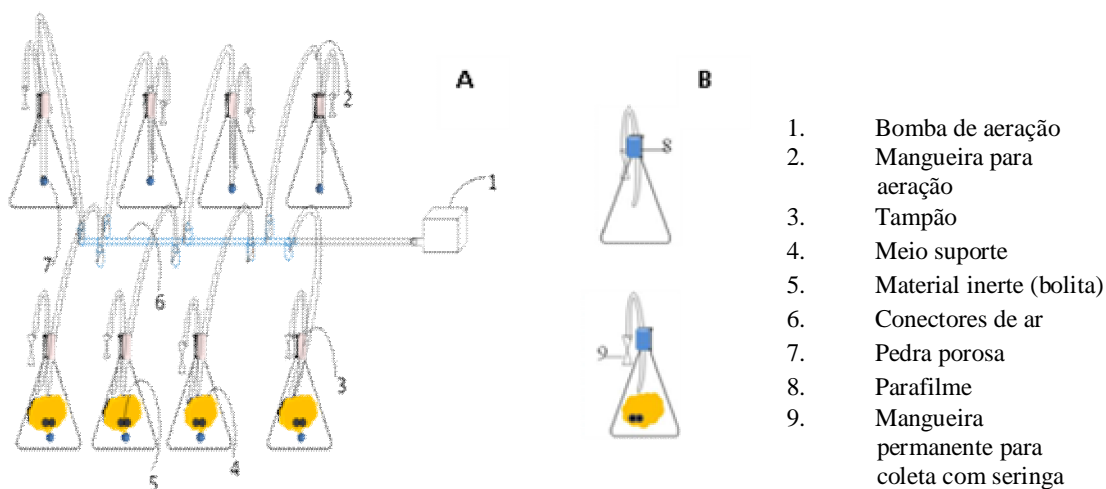


Figura 3-1: A- Esquema do método de aeração; B- Esquema do método não aerado.

Utilizou-se espuma de poliuretano como meio suporte, de acordo com Souza (2006), que foi acondicionado em tecido sintético (tule), formando um saquinho, contendo em seu interior quarenta cubos de 2 x 2 cm de espuma de poliuretano, pesando em média 2,80 g

cada . Os saquinhos foram numerados e colocados nos erlenmeyers, ocupando 10% do seu volume. Para que não ficassem totalmente emersos no efluente, foram depositadas duas bolinhas de vidro em cada saquinho, de modo que a maior parte do meio suporte ficasse submersa na fase líquida. Os fungos foram separados do meio de cultura por raspagem micelial, misturados, pesados em balança analítica e posteriormente foram inoculados em média de 13,5 g de biomassa fúngica por erlenmeyer. Todo o material foi esterilizado a 121°C por 15 min. Para evitar a contaminação do experimento com microrganismos indesejáveis, a cultura mista de fungos foi inoculada nos erlenmeyers em Câmara de Fluxo UV. Os erlenmeyers foram mantidos em Câmara Incubadora DBO a 30°C. O teste teve duração de 28 dias devido à pequena quantidade de efluente existente.

Os testes na condição não aerada restrita foram realizados nas concentrações 15 e 1,5 gDQO.L⁻¹ de manipeira e 1 gDQO.L⁻¹ de substrato sintético. A concentração de 15 gDQO.L⁻¹ foi feita apenas no meio sem meio suporte, pois acreditava-se no não desenvolvimento de fungos nesta condição.

3.3.7 Coletas e análises

As amostras foram coletadas utilizando-se seringa de plástico de 5 ml, sendo devolvidas aos erlenmeyers quando analisado apenas o pH. Inicialmente as coletas para as análises eram realizadas em um intervalo de três dias e posteriormente de acordo com o consumo de DQO nos testes. No teste preliminar foram feitas determinações de pH e DQO no início e fim do teste.

As variáveis físico-químicas determinadas foram: DQO, sólidos totais, sólidos voláteis totais, pH, NT, NO₂⁻, NO₃⁻, NH₃/NH₄⁺, SO₄²⁻ e S²⁻. As medições de pH foram realizadas diariamente e as análises de NO₂⁻ e SO₄²⁻ e série de sólidos foram realizadas no início e término do teste. Todas as amostras para DQO foram filtradas (filtro de 0,45 µ). Em todos os experimentos as determinações foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Caracterização da manipueira

Os parâmetros utilizados para a caracterização da manipueira estão de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) e são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3-1: Caracterização da manipueira

Parâmetros	Unidade	Resultado
Acidez volátil	mg.L ⁻¹	9257,97
Alcalinidade	mg.L ⁻¹	ND*
Condutividade	µS.cm ⁻²	7,93
DQO	mg.L ⁻¹	79,67
Nitrogênio amoniacal	mg.L ⁻¹	298
Nitrogênio nitrato	mg.L ⁻¹	18
Nitrogênio kjeldahl	mg.L ⁻²	2908,8
pH		4,41
Salinidade	Ψ	4,43
Sólidos totais	g.L ⁻¹	1,28
Sólidos fixos totais	g.L ⁻¹	0,15
Sólidos voláteis totais	g.L ⁻¹	1,13
Sulfeto total	mg.L ⁻¹	93,98
Turbidez	NTU	500

3.4.2 Teste Preliminar

O teste preliminar foi realizado para verificar o comportamento do conjunto micelial de fungos, em relação ao pH e ao consumo de matéria orgânica quando semeado em manipueira. Os resultados indicaram a aptidão dos fungos em elevar o pH da manipueira, combinado com remoção de DQO, sem adição de substâncias alcalinas ao meio (Tabela 3-2)

Tabela 3-2: Variação de pH e remoção de DQO pela cultura mista de fungos cultivados em manipueira, em 10 dias de experimento.

Substrato	pH inicial	pH final	DQO consumida (g)	%DQO consumida
Manipueira	4,5)3	7,19	18	80
Manipueira + MDA	4,62	6,80	15	27
MDA (controle)	5,60	4,76	23	24

Nas placas com manipueira foi observado um acentuado desenvolvimento de *Aspergillus*. No meio MDA com manipueira o fungo que alcançou o crescimento relevante foi o *Scedosporium*, o qual junto ao *Paecilomyces* obteve o crescimento ressaltado na placa controle.

Velmurungan *et al.* (2010) isolou e identificou fungos retirados de uma amostra de solo contaminado por chumbo e cianeto. Posteriormente estes fungos foram usados com sucesso no processo de bioissorção de chumbo em soluções aquosas. *Aspergillus* e *Paecilomyces* são usados na biorremediação, conhecidos por degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Sack *et al.*, 1997), e diversos outros poluentes (Singh, 2006), como o fenol, que junto ao para-cresol, também é eficientemente degradado por *Scedosporium* sp., usando esses como fonte de carbono. *Aspergillus Níger* originado em águas residuárias de indústria de ácido cítrico demonstrou eficiência na adsorção de chumbo em soluções aquosas (Jianlong *et al.*, 2001). *Paecilomyces* sp. é utilizado na remoção de cor de efluentes da indústria de papel, através da degradação de lignina relacionada a compostos fenólicos (Singh, 2006).

3.4.3 Teste de Biodegradabilidade

Os resultados do teste preliminar indicaram a possibilidade de duas configurações para o tratamento da manipueira utilizando fungos: i) tratamento de fase única, no qual se visa à máxima remoção de matéria orgânica e; ii) tratamento preliminar, cujo objetivo é elevar o pH do meio, tamponando o sistema, combinado com a menor remoção de matéria orgânica possível, possibilitando a digestão anaeróbia como tratamento principal. Dessa forma, o teste de biodegradabilidade foi realizado com o objetivo de conhecer as condições adequadas do meio para o desenvolvimento do conjunto micelial de fungos, buscando assim um tratamento biológico eficiente para efluentes de rápida acidificação.

Foram testados concentrações de manipueira consideradas baixas ($1,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$), média ($7,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$) e alta ($15,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$). Para as concentrações de $1,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$, o tempo de remoção de matéria orgânica foi menor nas condições aeradas, quando comparado às outras condições, exceto para a condição NAER+ que removeu 85% da DQO presente no meio quatro dias mais cedo do que nas outras condições (Tabela 3.3).

Ainda se referindo a concentração de $1,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$, foi observado que para as condições aeradas, o uso do meio suporte não influenciou no tempo de remoção da matéria orgânica. No entanto, para a condição NAER, a presença do meio suporte aparentemente influenciou no tempo de remoção de DQO, pois para a condição NAER+, o tempo de remoção foi 55% menor comparado à NAER (Tabela 3.3).

Tabela 3-3: Tempo de remoção de DQO, pH final e concentração de amônia em todas as concentrações e condições dos testes com manipueira, realizados com meio suporte (+) e sem meio suporte.

Condição	DQO Inicial (g.L1)	Tempo de remoção de 85% de DQO ^a	pH Final	NH ₃ (mg.L ¹)
AE	1,5	16	8,1	8
	7,0	9	9,2	59
	15,0	22	9,4	39
AE+ ^b	1,5	16	8,6	ND
	7,0	9	9,3	37
	15,0	9	9,2	47
NAE	1,5	25	8,7	62
	7,0	24	8,8	262
	15,0	23	8,8	457
NAE+	1,5	23	8,4	99
	7,0	24	8,7	293
	15,0	16	8,9	212
NAER	1,5	27	8,2	84
	15,0	ND ^d	4	ND
NAER+	1,5	12	8,5	60

a: tempo requerido (em dia) para o consumo de 85% da DQO presente no meio;

b: sigla para meio suporte;

c: pH inicial 4,5 de todas as condições e concentrações do teste;

d: não determinado

Dessa forma há duas possibilidades que podem explicar a influência do meio suporte nas condições NAE e NAER: i) o meio suporte promove o melhor contato entre os fungos e o efluente; ii) existência de oxigênio residual nos interstícios do meio suporte. Avaliando as duas possibilidades acredita-se que a segunda seja a hipótese mais aceitável. Foi observado visualmente que os fungos não aderiram ao meio suporte eliminando a primeira opção, e como diariamente era feita uma agitação dos erlenmeyers, acreditamos que o oxigênio residual presente nos interstícios escapava para a fase líquida no momento dessa agitação, ajudando dessa maneira as atividades metabólicas dos fungos, beneficiando assim na remoção de matéria orgânica do meio.

A remoção de DQO de todas as condições testadas esteve entre 85 e 94%, exceto para a NAER com 15,0 gDQO.L⁻¹, que removeu apenas 53% durante 30 dias de experimento e levou 75 dias para remover 85% da matéria orgânica presente no meio, descartando assim a possibilidade desta condição ser usada para a biorremediação.

Os resultados dos testes com 1,0 gDQO.L⁻¹ realizados com glicose (dados não mostrados), indicaram o comportamento semelhante ao ocorrido nos testes de 1,5 gDQO.L⁻¹ realizados com manipueira, em relação ao tempo de remoção de matéria orgânica e a influência do meio suporte. No entanto, houve diferença em relação ao comportamento do pH nos testes

(Figura 3.2), causada pela produção de ácidos orgânicos e CO_2 durante a fermentação da glicose, de acordo com Zhang (2005) a redução do pH pode ser interrompida com o término da glicose no meio, o que ocorreu por volta do segundo dia do experimento, diferente do acontecido com os testes de manipueira, nos quais houve aumento logo após o início do experimento. Porém, mesmo após o aumento do pH nos testes de $1,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$, este não atingiu o pH dos testes de baixa concentração de manipueira, 8,1 na condição AE e o máximo de 8,7 na NAE.

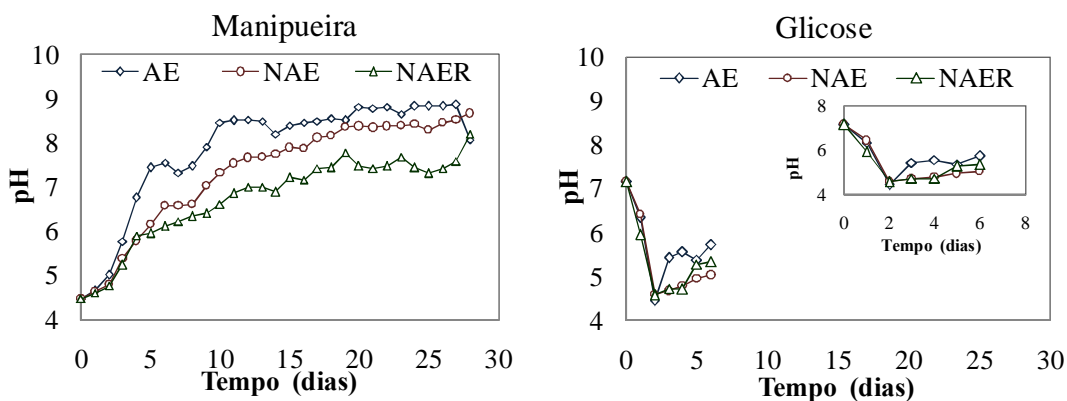


Figura 3-2: Variação do pH durante os testes realizados nas condições aerada (AE), não-aerada (NAE) e não-aerada restrita (NAER), com manipueira ($1,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$) e glicose ($1,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$), esta em duas escalas de tempo.

De acordo com Griffin (1994), o metabolismo do fungo ao crescer, altera o pH, seja pela absorção de ânions ou cátions ou pela produção de ácidos orgânicos, CO_2 ou amônia. A carência de nitrogênio no meio padrão do substrato sintético (72 mg.L^{-1}), presente na forma de NH_4Cl , explica a deficiência na elevação do pH, pois a produção de NH_3 , a qual é responsável pela alcalinidade produzida no meio provém do nitrogênio presente neste.

De acordo Singh, (2006), em ambientes com ausência de oxigênio, as taxas de biodegradação são insignificantes, porém como já descrito, os resultados indicaram atividades fúngicas nos meios não aerado e não aerado restrito. Takaya (2002), afirma que, dependendo da concentração de oxigênio no meio em que se encontram, os fungos utilizam rotas metabólicas alternativas como a desnitrificação e amonificação obtendo dessa forma o oxigênio necessário para a biodegradação e alcalinidade para a alteração do pH. No presente estudo acredita-se que o oxigênio necessário para a degradação da matéria orgânica presente nos testes NAE e NAER, foi obtido das parcelas residuárias de oxigênio que periodicamente poderiam adentrar nos ambientes e no caso da presença do meio suporte, também do O_2 residual presente. Essa hipótese se deve a fatores, como a possível entrada de oxigênio no momento da retirada de amostra, assim como na devolução de amostra ao meio após a medição do pH, e ao fato de a vedação dos erlenmeyers ter sido

feita com parafilme, o qual pode não ter garantido o completo selamento do meio. Todas essas alternativas podem estar ligadas ao suprimento de O₂ nos meios não aerados.

Para as concentrações de 7,0 e 15,0 gDQO.L⁻¹, assim como no restante dos testes, o menor tempo de remoção ocorreu nas condições aeradas. Em 9 dias de experimento já havia sido removidas cerca de 41 e 86% da matéria orgânica presente no meio AE e pH 7,7 e 8,9, enquanto que na condição NAE a remoção era de apenas 26 e 46% com o pH 5,2 e 6,4 nas concentrações alta e média, respectivamente. De acordo com Zhang *et al.* (2005), a falta da remoção de DQO pode ser causada por uma supressão de reações devido à limitação de oxigênio dissolvido, a inibição do baixo pH ou a combinação de ambos. De acordo com Singh (2006), os passos iniciais no catabolismo por fungos envolvem oxidação do substrato, assim, como nas condições aeradas o oxigênio livre era abundante, a remoção da DQO ocorreu em menor tempo assim como a elevação do pH. Como na condição NAE o oxigênio dissolvido era limitante isso pode ter interferido nas atividades dos fungos.

A remoção final de DQO foi elevada nas condições AE e NAE, atingindo remoções nas concentrações de 7,0 e 15,0 gDQO.L⁻¹ de 93 e 91% na condição AE e 92 e 88% para a NAE, respectivamente. Porém deve se considerar que o aumento progressivo do pH pode ter interferido na ação dos fungos, mascarando a real degradação da matéria orgânica presente nos meios, pois a morfologia e o crescimento dos fungos são influenciados pelo pH. Pirt e Callow (1959) relataram que culturas de *Penicillium chrysogenum* em estado estacionário reagiram ao aumento de pH acima de 6,0 com a redução no comprimento das hifas, o que atingiu um valor mínimo entre os pHs 7,0-7,4. Carlsen *et al.* (1995), verificaram a influência do pH na formação de α -amilase cuja produção máxima ocorre em torno de pH 6,0. A α -amilase é uma das principais enzimas envolvidas na degradação do amido (Antranikinyan, 1992), atuando sobre ligações α -1,4 do amido, produzindo oligossacarídeos lineares e ramificados (Forchiassin & Galvagno, 2010). O amido, principal fonte de carbono presente na manipueira, é um polímero composto de dois polímeros de alta massa molar: amilose e amilopectina em proporções variáveis. A amilose é um polímero de glicose linear com uniões α -1,4 e a amilopectina é um polímero de glicose α -1,4 com ramificações α -1,6 (Forchiassin & Galvagno, 2010). O aumento ou diminuição de pH leva à redução na taxa de reações químicas devido à destruição das enzimas celulares afetando a taxa de crescimento e, finalmente, a sobrevivência do microrganismo. De acordo com Cochrane (1958) os fungos toleram ampla faixa de pH, porém crescem e esporulam na faixa mais próxima ao pH neutro. Dessa forma foi observado que o aumento gradativo de pH, que no meio AE para as concentrações 7,0 e 15,0 gDQO.L⁻¹, alcançou, em média, o valor máximo de 9,3 e no meio NAE, 8,8, ambos tendo início com pH 4,5, pode ter interferido na produção de uma enzima importante envolvida na degradação de amido, intervindo assim nos resultados apresentados da remoção de DQO, pois os fungos são capazes de adsorver compostos em sua parede celular sem assimilá-los. No entanto, estudos sobre a influência do pH na remoção de DQO demonstram que os fungos *Aspergillus foetidus* e *A. niger*, mesmo tendo maior atividade

amilolítica em pH 4,0, a remoção de DQO de água residuária de indústria de beneficiamento de batata foi maior em pH 6,0 (Mishra, *et al.*, 2004).

Foi observada elevada produção de amônia nos meios, esta produção está relacionada diretamente ao consumo de NO_3^- e à amonificação. Embora as concentrações sejam irrelevantes, pode-se notar que, em média, durante os 13 primeiros dias do teste, houve consumo direto de NO_3^- (Figura 3-3). De acordo com Hall (2000), os fungos, em sua fase catabólica, para assimilar o NO_3^- devem primeiramente transformá-lo em NO_2^- via nitrato redutase e depois a NH_3 (ou NH_4^+) via nitrito redutase. Notou-se que a remoção de nitrato foi interrompida quando a concentração de amônia aumentou. Embora presentes no meio de todas as condições testadas, as concentrações de nitrato e de nitrito não justificam a concentração de amônia encontrada, acreditando-se então que esta seja provinda do nitrogênio orgânico presente no meio.

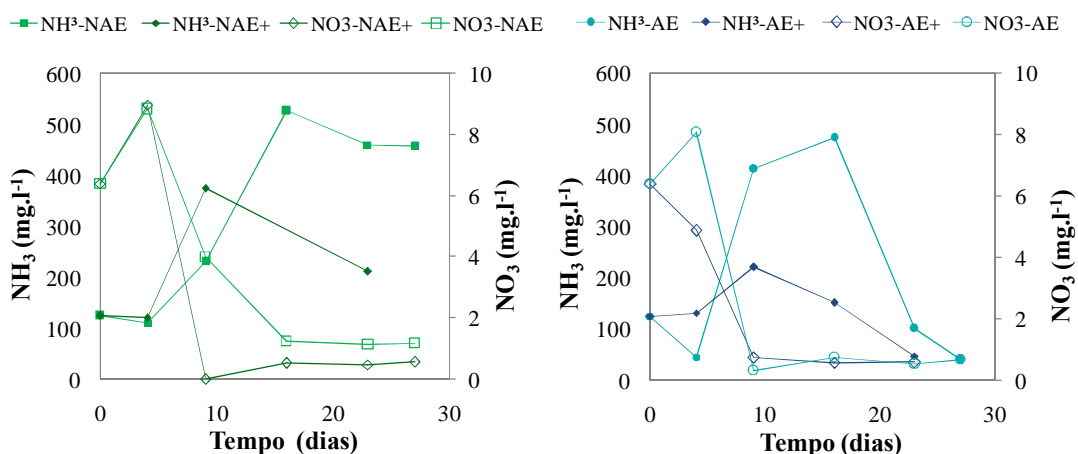


Figura 3-3: Relação entre produção de amônia e consumo de nitrato para as condições AE, AE+, NAE e NAE+ para a concentração de 15,0 gDQO.L⁻¹.

Segundo Zhou *et al.* (2002) a fermentação da amônia por fungos, está ligada a fosforilação do substrato, dessa forma a produção de amônia está associada à degradação do substrato, indicando que os fungos podem usar um sistema complexo de produção de ATP em condições com disponibilidade de oxigênio precária (Takaya, 2002). Devido ao consumo rápido da DQO presente no meio aerado, ocorreu uma produção elevada de NH_3 , o que desencadeou um aumento do pH. Porém a amônia se torna volátil quando o pH do ambiente se torna alcalino, como pode ser observado na figura 3.3. Quando o pH do meio aerado chega por volta de 8,6 e 8,8 nas concentrações alta e média respectivamente, ocorre um declínio visível na concentração de amônia. Verificou-se que no meio NAE a concentração de NH_3 alcançou valores superiores à do ambiente aerado a qual era 474 mg.L⁻¹ para 15,0 gDQO.L⁻¹ e 241 mg.L⁻¹ para 7,0 gDQO.L⁻¹, porém o pH não acompanhou essa elevação, chegando ao valor máximo de 8,8 mesmo com uma concentração máxima

de 526 mg.L⁻¹ na maior concentração de manipueira e 8,5 para 262 mg.L⁻¹, para a concentração média.

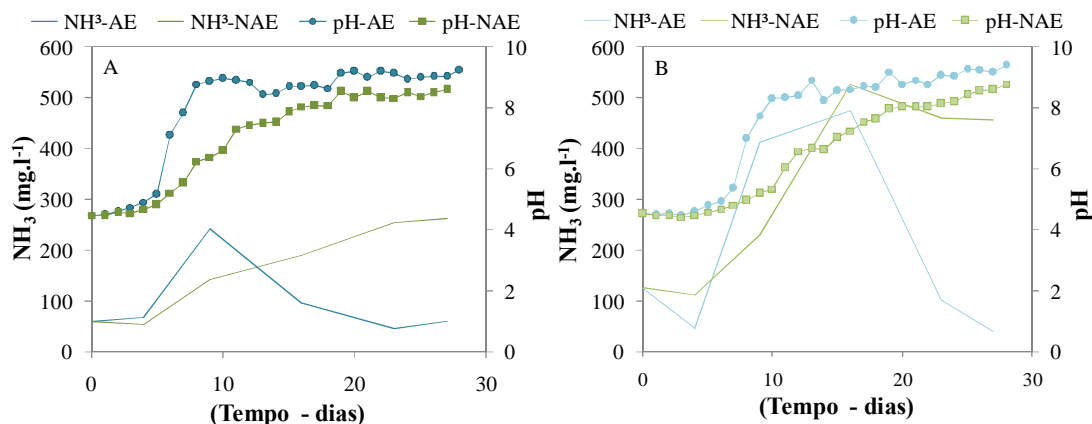


Figura 3-4: Relação entre produção de amônia e aumento do pH nas condições AE e NAE, para as concentrações de 7,0 (A) e 15,0 (B) gDQO.L⁻¹.

Como o meio aerado possibilitou a troca gasosa com o ambiente externo do erlenmeyer, acredita-se na hipótese de que o CO₂ produzido pelos fungos (ou parte deste) como produto metabólico, tenha deixado o ambiente. Assim, a amônia produzida pode alcalinizar o meio sem dificuldades. Contudo como no ambiente NAE o CO₂ metabolizado não escapa para o ambiente externo, a presença deste pode ter amenizado a ação da amônia como agente alcalinizante.

Foi observado que, para concentração média, a presença de meio suporte não influenciou o tempo de remoção de matéria orgânica, diferente do ocorrido na concentração de 15,0 gDQO.L⁻¹, quando a presença de meio suporte está associada a menores tempos de remoção de DQO, como mostrado na tabela 3.3. Isso é justificado pela provável aderência de matéria orgânica no meio suporte, pois a produção de amônia que está relacionada às atividades metabólicas dos fungos, ocorreu notadamente em menor quantidade nos testes com meio suporte (Figura 3.4).

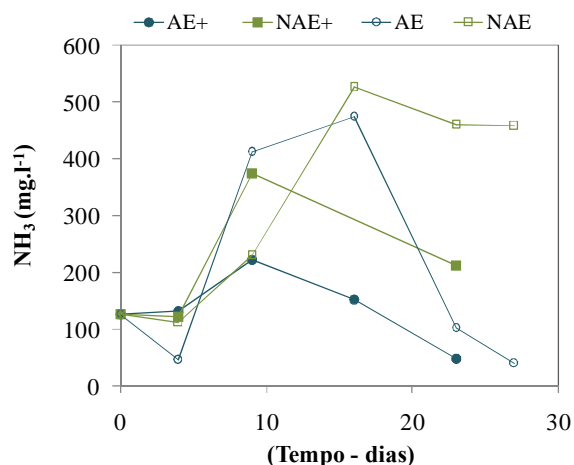


Figura 3-5: Amônia produzida entre os testes com e sem meio suporte, para as condições AE e NAE na concentração de 15,0 gDQO.L⁻¹.

Foi analisado que o desenvolvimento de biomassa fúngica ocorreu entre os pHs 4,5 e 7,5. Os primeiros a se desenvolver foram os testes da condição aerada, mostrando sinal de crescimento da biomassa logo após o 1º dia do início do experimento. Após 3 dias notou-se a formação de um fino biofilme sobre a fase líquida da condição NAE.

Na condição AE foi verificado o crescimento de biomassa nas paredes dos erlenmeyers, na mangueira de coleta, na pedra porosa usada para aeração, assim como no cabo que ligava o meio suporte ao tampão (quando presente), enquanto que na condição NAE era formado um biofilme denso. Na condição AE, o declínio da biomassa iniciou-se a partir do 8º dia, enquanto no meio NAE essa queda foi a partir do 16º dia, ambos com o pH aproximado de 7,7.

A supressão da biomassa pode estar relacionada ao fim da matéria orgânica presente no meio, ou ao elevado pH que, como já foi descrito, pode prejudicar as atividades dos fungos. De acordo com Papagianne (2004) um dos métodos utilizados para observar a lise das células fúngicas em culturas submersas, está baseado no declínio da biomassa, o que reforça a possibilidade de ter ocorrido adsorção de parte da matéria orgânica presente no meio.

Se considerarmos a aplicação das condições estudadas para escolher a configuração para o tratamento de manipueira provinda de uma fecularia da região, que tem a DQO em média de 16 g.L⁻¹ (Oliveira, 2007), pode-se verificar que a condição aerada se encaixa na possibilidade de ser utilizada como tratamento de fase única. A condição aerada mostrou grande eficiência na remoção de DQO (91%), porém com gasto energético devido ao processo de aeração do meio. Manilal *et al.* (1991) usaram biorreatores com cultura mista de *Candida utilis* e *Endomycopsis buliger*, para tratar efluentes da indústria de mandioca, resultando na redução de cerca de 94% de DQO em pequeno tempo de detenção hidráulica,

demonstrando a eficiência dos fungos como tratamento único para efluentes ricos em carboidratos.

No entanto, experimentos devem ser realizados em operação contínua, para estudar as condições ideais de pH no meio. Na figura 3.5 pode ser observado as diferenças ocorridas entre os meios AE, NAE e NAER, em relação à remoção de matéria orgânica e elevação do pH, para a concentração de 15,0 gDQO.L⁻¹. Embora o tratamento de fase única com fungos seja bastante estudado para remoção de compostos recalcitrantes, o enfoque não é dado à remoção de matéria orgânica, embora a mesma esteja presente na maioria dos estudos.

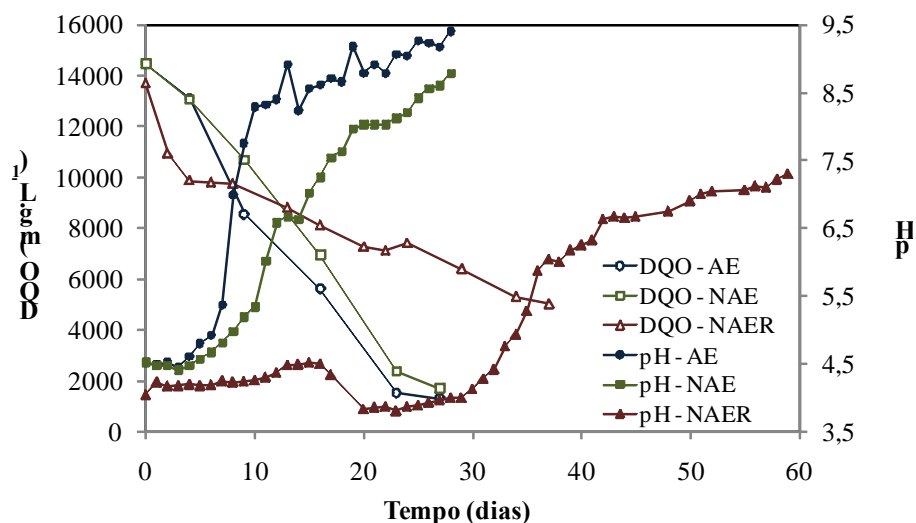


Figura 3-6: Remoção de DQO e elevação do pH para três diferentes condições: aerada (AE); não aerada (NAE); e não aerada restrita (NAER), para DQO inicial foi de 15,0 g.L⁻¹.

Outra possibilidade atraente para o tratamento da manipueira é a combinação do tratamento de fungos com a digestão anaeróbia, visando ao aproveitamento da matéria orgânica presente no efluente para a produção de energia, pela produção de metano. Os resultados indicaram que a condição não aerada pode ser utilizada como uma etapa preliminar ao tratamento anaeróbio. O problema decorrente na digestão anaeróbia dos efluentes de rápida acidificação, está relacionado ao baixo pH, que é prejudicial ao consórcio microbiano participante do processo e, como já é sabido, os fungos produzem metabólitos que podem alcalinizar o meio no qual se desenvolvem, sendo que para a condição NAE, o pH atingiu a neutralidade (6,0) em 11 dias, porém com cerca de 70% da DQO remanescente no meio. Dessa forma a elevada produção de amônia aliada à lenta remoção da DQO torna a condição NAE uma etapa preliminar eficiente para posterior digestão anaeróbia da manipueira. Como Yesilada *et al.* (1995) que utilizaram *Funalia trogii* no pré-tratamento de efluentes da indústria de azeite, resultando em remoção de 40% da DQO e Yesilada *et al.* (1998) que utilizaram *Trametes versicolor* para o tratamento

deste tipo de efluente, de onde foram extraídos 88% de compostos fenólicos e 50% da DQO, possibilitando assim a ação do consórcio microbiano da DA.

Para a condição NAER o uso de fungos no tratamento de efluentes foi ineficiente, pois, durante 30 dias de experimento foram removidos cerca de 50% da matéria orgânica e a elevação concreta do pH iniciou-se após 29 dias de teste, não se encaixando, dessa forma, em nenhuma das opções de tratamento indicado.

3.5 Conclusões

A cultura mista de fungos mostrou habilidade em remover DQO de manipueira com um pH inicial de 4,5 e DQO de 15,0 gDQO.L⁻¹, elevando o pH para valores acima de 8,5, em 27 dias de experimento, com 13% de DQO remanescente, em ambas condições, aerada e não aerada.

Os compostos de nitrogênio têm um papel importante no tamponamento do sistema, considerando que nos experimentos realizados com glicose, o pH do meio não foi recuperado, mesmo trabalhando com concentração inicial mínima de DQO (1,0 gDQO.L⁻¹), comparando-se com os altos valores de pH atingidos nos testes realizados com manipueira, mesmo à altas concentrações.

A cultura mista de fungos estudada foi eficiente no tratamento de manipueira, tanto como tratamento único, eficiente na remoção da DQO (91%), na condição aerada, quanto como uma etapa preliminar à digestão anaeróbia, na condição não aerada, tornando o pH do meio adequado ao consórcio microbiano do tratamento anaeróbio, viabilizando assim a produção de energia.

Não houve aderência expressiva de biomassa fúngica na espuma de poliuretano usada como meio suporte.

3.6 Referências

APHA, AWWA, WEF. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21. Ed. Washington DC: American Public Health Association.

Berg J. M., Tymoczko J. L. e Stryer L. (2004). *Bioquímica*. 5 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro ó RJ, Brasil.

Boncz M. A., Bezerra L. P., Ide C. N. e Paulo P. L. (2008). Optimisation of biogas production from anaerobic digestion of agro-industrial waste streams in Brazil. *Water Science and Technology*, **58**(8), 1659-64.

Braga A. F. M. (2010). *Desenvolvimento de reator anaeróbio para tratamento de efluentes de rápida acidificação*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande - MS, Brasil.

Chernicharo C. A. (2007). *Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. v.5. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG, Brasil.

Cochrane V. W. (1958). *Physiology of Fungi*. New York, Wiley. USA.

Cordeiro G. Q. (2006). *Tratamento de manipueira em reator anaeróbio compartimentado*. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto ó SP, Brasil.

Coulibaly L., Gourene G. e Agathos, N. S. (2003). Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology*, **2** (12), 620-630.

Ebersberger I., Gube M., Strauss S., Kupczok A. e Eckart M. (2010). A stable backbone for the fungi. *Nature Proceeding*. <http://precedings.nature.com/documents/2901/version/1> (acessado em 27 de maio de 2011).

Eggen T. e Majcherczyk A. (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Internationl Biodeterioration & Biodegradation*. **41**, 111-117.

Fioretto R. A. (2000). "Uso direto da manipueira em fertirrigação" in Cereda M. P., *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. São Paulo, Fundação Cargil, 66 ó 79.

Galvano M. A. e Forchiassin F. (2010). *Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo*. Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed. cap 4. 125p.

Griffin D. H. (1994). *Fungal Physiology*. 2 ed., New York: Wiley ó Liss, USA. 458p.

Griffith G. W., Baker S., Fliegerova K., Liggenstoffer A., Giezen M. van der G., Voigth K., Beakes G. (2010). Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *IMA Fungus*, **1**(2), 181ó 185.

- Hall N. e Tomsett A. B. (2000). *Microbiology*, 146: 1399 - 1406
- Leucena M. V. e Chernicharo C. A. L. (2005). Avaliação experimental da compostagem de RSU submetidos a etapa prévia de tratamento anaeróbio. *23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária*. Anais. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, p.09.
- Liggenstoffer A. S., Youssef N. H., Couger M. B. e Elshahed M. S. (2010). Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and nonruminant herbivores. *ISME Journal*, 4, 122561235.
- Manilal, V. B., Narayanan C. S. e Balagopalan C. (1991) Cassava starch effluent treatment with concomitant SCP production. *World J. Microbiology Biotechnology* 7:1856190.
- Mishra B. K., Arora A, Lata. (2004). Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 94(1): 9-12.
- Oliveira K. R. F. de (2007). *Processos ecotecnológicos no tratamento de efluentes líquidos de fecularia*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande - MS, Brasil.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, **22**, 189-259.
- Pohland F. G. (1986) Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 585- 602.
- Ribas M. M. F. e Barana A. C. (2003). Start-up adjustment of a plug-flow digester for cassava wastewater (manipueira) treatment. *Scientia Agricola*, **60** (2), 223-229.
- Sack U., e Fritsche W. (1997). Enhancement of pyrene mineralization in soil by wood-decaying fungi. *FEMS Microbial Ecology*, **22**, 77683.
- Sampaio, B. M. L. (1996). *Viabilidade do processo de tratamentos de resíduo da industrialização da mandioca em sistemas de duas fases*. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Maringá. Maringá ó PR, Brasil.
- Samulak R., Bittencourt J. V. M., Pilatti L. A. e Kovaleski J.L. (2010). Biodigestor como opção para tratamento de resíduos agroindustriais. *Encontro Paranaense de Empreendedorismo e Gestão Empresarial*. Anais. Ponta Grossa, p. 1-10.
- Santaella S. T., Campos J. R. e Elinares I. L. (1996). Perspectiva de remoção de cor (substâncias húmicas) de águas destinadas ao abastecimento público mediante processo biológico. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. **1**, 14-17
- Silva da R. R. e Coelho G. D. (2006). Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de Capacidade de monitores e educadores. São Paulo ó SP, Brasil.

Silva M. A., Griebeler N. P. e Borges L. C. (2007) Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **11**(1), 108-114.

Singh H. (2006). *Mycorremediation*. New Jersey, John Wiley & Sons, 592p.

Singh U. D., Sethunathan N. and Raghu K. (1991) Fungal degradation of pesticides. In: *Handbook of Applied Mycology: Soil and Plants*, D.K. Arora, B. Rai, K.G. Mukerji, and G.R. Knudsen, eds. Marcel Dekker, New York, Vol. 1, pp. 541-658.

Sousa O. L., Oliveira E. C., Félix J. P. L., Salek J. M., Leitão R. C., Melo V. M. M e Santaella, S. T. (2006). Tratamento biológico de águas residuárias de indústria petroquímica através de reatores aeróbios inoculados com *Candida* sp. In: *Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos*. Editora Universitária da UFPE. Recife, 149-165.

Takaya, N. (2002). Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**, 506-510.

von Sperling M. (2005). *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto. Princípios de tratamento biológico de águas residuárias*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte ó MG, Brasil.

Zhang Y., Rittmann B. E., Wang J., Sheng Y., Yu J., Shi H. e Qian Y. (2005). High carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. *Process Biochemistry Journal*. **40**, 857-863.

Zhou Z., Takaya N., Nakamura A., Yamaguchi M., Takeo K. e Shoun, H. (2002). Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *Journal of biological chemistry*. **277**, 1892-1896.

4

Digestão anaeróbia de manipueira pré-tratada por fungos

4.1 Resumo

A manipueira, água residuária do processamento de mandioca, contém grande quantidade de compostos que sofrem rápida acidificação, o que exige um sistema de tamponamento para permitir uma operação estável durante a digestão anaeróbia (DA). Foi estudada a possibilidade de incluir uma etapa preliminar de tratamento por fungos à DA buscando elevar o pH, visando o tamponamento da manipueira. A manipueira passou por um pré - tratamento por fungos em condição não aerada, até chegar a uma demanda química de oxigênio (DQO) de 10 g.L^{-1} e pH 6,4 (Teste A) e pH 5,7 (Teste B). A manipueira pré-tratada por fungos (MPTF) foi submetida ao processo de digestão anaeróbia com a adição de diferentes agentes tamponantes (CaCO_3 e NaHCO_3) e sem adição de tamponante. Os resultados do teste A, apontaram para a possibilidade da operação do sistema sem a adição de tampão, resultando em um pH final em torno de 7,0. A aplicação de um tratamento preliminar por fungos apresenta-se como uma estratégia promissora para permitir a digestão anaeróbia de águas residuárias ricas em carboidratos e açúcares.

4.2 Introdução

Efluentes agroindustriais provenientes das indústrias de alimentos que utilizam matérias-primas como mandioca, cana de açúcar e batata, geralmente não contêm nenhum componente recalcitrante, para impedir o seu tratamento por processos anaeróbios. No entanto, o principal problema está na grande quantidade de compostos que sofrem fermentação facilmente, resultando em um efluente de rápida acidificação. Estes efluentes possuem o pH inicial abaixo da faixa ideal para o processo estável da digestão anaeróbia (DA), o qual está na faixa da neutralidade (Aquino e Chernicharo, 2005). Para a aplicação da DA, usando fase única para o tratamento destes efluentes (por exemplo em reator UASB) é recomendada a operação com baixa carga orgânica volumétrica (COV), como por exemplo, aplicando elevados tempos de detenção hidráulica (TDH) (Ribas-Döll e Foresti, 2010; Annachhatre e Amatya, 2000), ou promovendo a diluição do efluente pela recirculação deste. Além disso, devem ser aplicados mecanismos para proporcionar tamponamento suficiente ao sistema (Harada *et al.*, 1996; Siqueira *et al.*, 2008). Formagini *et al.* (2010) tratando vinhaça em um reator UASB, comprovaram a possibilidade do controle do pH por meio da adição de uréia. Apesar do risco representado por sua toxicidade para a biomassa metanogênica, a uréia apresentou-se como uma alternativa viável para evitar a acidificação, demonstrando que a adição de $0,215 \text{ g}_{\text{uréia}} \cdot \text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ impediu completamente a acidificação em experimentos conduzidos em batelada.

Os resultados apresentados no capítulo 3, no qual a capacidade dos fungos em elevar o pH do meio durante a degradação da manipueira foi confirmada, motivaram a realização de um estudo, para avaliar a viabilidade da digestão anaeróbia de efluentes pré-tratados por fungos, é apresentado neste capítulo.

A capacidade dos fungos em degradar diversos poluentes, resistir a variações ambientais e alterações no pH, entre outros, está relacionada ao sistema enzimático inespecífico que possuem, capaz de desestabilizar moléculas com grande estabilidade química, além de lançarem enzimas no substrato onde colonizam, característica essa de todos os fungos, e dessa maneira, sofrendo menos a ação toxica do ambiente. Desse modo, tem sido largamente estudada a utilização destes fungos em processos de biorremediação de materiais, como solos, resíduos e efluentes industriais, contaminados com substâncias de difícil degradação biológica (Silva e Coelho, 2006).

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura são realizados com culturas puras, em condições restritas e controladas, o que dificulta a aplicação do processo em escala real. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade de uma cultura mista de fungos em aumentar o pH inicial e a capacidade de tamponamento da manipueira, avaliando a estabilidade do processo durante os testes de biodegradabilidade, visando utilizar o tratamento com fungos como uma etapa preliminar à digestão anaeróbia.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Informações preliminares

Biomassa - A biomassa utilizada foi proveniente de um reator UASB em escala de bancada utilizado para o tratamento de vinhaça (originária de destilaria de açúcar e etanol) sob condições mesofílicas. O lodo, de aspecto granular, foi armazenado a 4°C e ativado à temperatura ambiente ($28,2 \pm 2,5^\circ\text{C}$) antes da sua utilização. A ativação foi realizada utilizando uma solução sintética, com 16 gDQO.L^{-1} , composta de uma mistura padrão de 80% de açúcares (glicose e sacarose 13% a 87%) e 20% de acetato (percentuais em relação a concentração de DQO) e nutrientes de acordo com Chernicharo (2007). Durante a ativação foram realizadas treze (13) alimentações.

Manipueira (Águas residuárias do processamento da mandioca) - A manipueira utilizada foi proveniente de uma pequena fábrica de farinha de mandioca, localizada a 60 km de Campo Grande, foi coletada em um tanque de sedimentação situado logo abaixo da prensa e transferida para o laboratório, onde era mantida em repouso por 2 horas para decantação do material suspenso e amido residual. O sobrenadante resultante foi homogeneizado e transferido para frascos de politereftalato de etileno (PET) e armazenado a -18°C . Antes da utilização, os frascos eram descongelados em temperatura ambiente. A concentração inicial da manipueira (sobrenadante) foi de 60 gDQO.L^{-1} . A manipueira era diluída com água da torneira de acordo com a concentração exigida em cada experimento. O pH após a diluição foi de cerca de 4,4.

Fungos – Um conjunto micelial de fungos, que se desenvolveu naturalmente em um reator anaeróbio de fluxo horizontal, o qual tratava efluente de fecularia (pH 4,5), previamente isolado e identificado, foi utilizado no pré-tratamento da manipueira. Estes fungos foram cultivados em meio MDA com o pH em torno de 4,5. A cultura micelial usada no pré-tratamento foi feita através da raspagem micelial dos fungos, onde o micélio foi retirado do meio com a ajuda de espátula, posteriormente, foi realizada a mistura destes em proporções semelhantes e pesados.

Manipueira pré-tratada por fungos (MPTF) ó De acordo com os resultados obtidos no capítulo 3, foi escolhida a melhor condição para realizar o tratamento preliminar por fungos da manipueira a ser utilizada nos testes de biodegradabilidade. Como a amônia parece desempenhar papel importante no sistema de tamponamento, decidiu-se preparar a MPTF utilizando a condição não aerada, que está mais próxima das condições originais em que a cultura mista foi desenvolvida, e onde a amônia parece ter sido mantida no meio.

Foram preparados seis litros da MPTF em duas garrafas de vidro (Samavidros, Brasil) de 4 litros. Cada garrafa foi com 3 L de manipueira esterilizada e diluída a uma concentração inicial de $17,7 \text{ gCOD.L}^{-1}$. Após pesagem, 90 g de biomassa fúngica foram inoculadas em cada frasco, dentro de uma capela de fluxo laminar UV. Os frascos foram selados com

parafilme, simulando a condição não aerada, e uma seringa de 5 mL foi conectada à parte superior do frasco com um tubo estreito de plástico, atingindo o fundo para a coleta de amostra líquida. Os frascos foram incubados a 30°C. Para acompanhar a elevação do pH e remoção da DQO, amostras foram coletadas diariamente, retornando-as para o frasco quando somente o pH era medido. O pH desejado para a realização dos testes de biodegradabilidade anaeróbia (Teste A e Teste B) era em torno de 6,5 para o teste A e 5,5 para o teste B, com um consumo mínimo de DQO. A MPTF utilizada para o teste A atingiu o pH 6,4 com remoção de 50% da DQO presente no meio. O efluente utilizado para o teste B, chegou a um pH de 5,7, com 43,5% de DQO remanescente. Para ambas as soluções foram necessários, em média, 31 dias para atingir o pH desejado. Quando as soluções estavam prontas para uso (valores de pH desejados) estas foram filtradas, utilizando um tecido do tipo voal, para a remoção dos fungos e posteriormente foram transferidas para os frascos para o teste de biodegradabilidade anaeróbia, sem esterilização.

4.3.2 Teste de biodegradabilidade anaeróbia

O experimento foi realizado em frascos de vidro tipo âmbar com capacidade de 250 mL, os quais foram preenchidos com 196 mL de MPTF com pH inicial de 6,4 para o teste A e pH 5,7 para o teste B, e manipueira diluída como frasco controle, para ambos os testes. A DQO inicial para ambos os testes foi em torno de 13 g.L⁻¹ (DQO total) e 10 g.L⁻¹ (DQO solúvel, usando um filtro de 0,45 µ). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Como o objetivo do experimento era verificar a capacidade de tamponamento da manipueira pré-tratada por fungos, o teste de biodegradabilidade foi realizado com diferentes agentes tamponantes e comparados com um controle, sem a adição de tampão. Bicarbonato de sódio foi utilizado na concentração de 0,6 gNaHCO₃.gDQO⁻¹ (Formagini *et al*, 2010). Quando o tampão utilizado foi o calcário, 21 g de pedras de CaCO₃, com diâmetro entre 9,5 mm e 12,7 mm (ABNT, 2003), foram adicionadas por frasco. Para os frascos controle foi utilizada manipueira diluída e NaHCO₃ como tampão. Nos testes sem adição das pedras de CaCO₃, 21 g de material inerte foram adicionados nos frascos para manter igualdade em volume e *headspace* (13%). Lodo foi adicionado nos frascos à uma concentração de cerca de 4 gSVT.L⁻¹. O pH inicial não foi corrigido para as diferentes condições testadas. O pH inicial considerado, é a medida após a adição de tampão (ou não), antes de mudança de fase gasosa.

Os frascos foram fechados com rolhas de borracha butílica e o *headspace* foi substituído por N₂/CO₂ (70/30 White Martins, Campo Grande, BR), quando NaHCO₃ ou CaCO₃ eram usados como agentes tamponantes, e com N₂ puro (White Martins, Campo Grande, BR) quando tampão não foi acrescentado. Os frascos foram incubados a temperatura constante de 30°C e foram agitados manualmente, uma vez por dia. O metano foi medido pelo método de deslocamento de líquido (Aquino e Chernicharo, 2007) usando hidróxido de sódio 16% (NaOH) para absorver o CO₂ presente na fase gasosa. Inicialmente a produção de CH₄ era medida diariamente, depois os intervalos para a medição eram avaliados de

acordo com os resultados da produção anterior. As amostras para ácido acético e DQO foram coletadas de acordo com o CH_4 deslocado. O nitrogênio total foi medido após a conclusão do teste. A atividade metanogênica específica foi calculada pelo aumento linear de metano, dividida pela quantidade de SVT presentes em cada frasco. Os procedimentos analíticos foram realizados de acordo com o APHA, (2005).



Figura 4-1: Imagem das medições de metano utilizando o método de deslocamento de líquido

4.4 Resultados e discussão

Os resultados não são repetidos neste capítulo, no entanto os principais aspectos são discutidos, para dar base à discussão dos testes de biodegradabilidade. Não foi observado crescimento ou atividade da cultura mista de fungos sob condições anaeróbias restritas (resultados não mostrados). Quanto aos resultados de pH, a condição aerada (AE) apresentou um aumento de pH de 0,91 unidades de $\text{pH}\cdot\text{d}^{-1}$, em comparação a 0,62 unidades de $\text{pH}\cdot\text{d}^{-1}$ para a não aerada (NAE) e, 0,28 unidades de $\text{pH}\cdot\text{d}^{-1}$ para a condição da não aerada restrita (NAER) (Figura 6, Capítulo 3). Os valores máximos de pH alcançados em cada condição foram 9,4, 8,8 e 8,4, para as condições AE, NAE e NAER, respectivamente. Segundo Griffin (1994), os fungos podem alterar o pH do meio devido ao transporte diferenciado de cátions e ânions durante o transporte de substrato e pela sua utilização metabólica de nitrogênio, como por exemplo a desassimilação de nitrato, quando a amônia é produzida a partir de nitrato e nitrito. A concentração máxima de amônia alcançou em média de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para ambas condições, caindo para $39 \text{ mg}\cdot\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ na condição AE, quando o pH atingiu 8,6, o que pode ter sido causado pela transferência de amônia para a fase gasosa.

Neste estudo o interesse era chegar a um pH próximo ao neutro, com a menor remoção da DQO possível, para a realização do teste de biodegradabilidade, considerando o tratamento com fungos como uma etapa de pré-tratamento, visando um processo anaeróbio estável.

4.4.1 Testes de biodegradabilidade

O teste realizado com o MPTF em um pH de 6,4 (teste A) teve melhor desempenho que o teste realizado com o efluente pré-tratado até o pH de 5,7 (Teste B), tanto em relação a taxa de depleção de DQO, quanto à formação de metano. Não foi observada fase lag durante nenhum dos testes realizados. No entanto, o desempenho mais fraco do teste B pode ser confirmado pelos resultados mais baixos alcançados da atividade metanogênica específica (Tabela 4.1).

Tabela 4-1: pH médio final, concentração média de nitrogênio total (NT) e atividade metanogênica específica (AME) para os 2 testes utilizando manipueira pré-tratada por fungos (MPTF) e somente com a manipueira (controle). Os resultados são a média obtida com as triplicatas.

Substrato	Tampão	MPTF pH 6,4 (Teste A)			MPTF pH 5,7 (Teste B)		
		pH final	NT mg.L ⁻¹	AME mgDQO.gSVT ⁻¹ .d ⁻¹	pH final	NT mg.L ⁻¹	AME mgDQO.gSVT ⁻¹ .d ⁻¹
Manipueira	NaHCO ₃	7,31 ± 0,02*	347 ± 49	17,72 ± 1,53	7,42 ± 0,04*	388 ± 59	20,09 ± 2,04
MPTF	-	7,21 ± 0,03	637 ± 37	37,43 ± 1,76	6,02 ± 0,19	553 ± 67	28,80 ± 1,12
MPTF	CaCO ₃	7,03 ± 0,02	577 ± 40	58,43 ± 1,09	6,96 ± 0,06	613 ± 136	36,86 ± 1,64
MPTF	NaHCO ₃	7,72 ± 0,09	523 ± 146	75,43 ± 3,47	7,64 ± 0,05	480 ± 117	35,59 ± 4,10

*Desvio padrão.

Para os testes sem a adição de tampão, ou quando o tampão utilizado promoveu liberação lenta de alcalinidade (por exemplo, CaCO₃), o pH inicial no meio era de 5,8, e a produção de metano foi mais lenta, possivelmente devido ao pH desfavorável para a ocorrência da metanogênese (Chernicharo, 2007), observando-se também o acúmulo de ácido acético nos frascos (Figura 4.2). Ao comparar os resultados de AME do teste A (pH 6,4) com o teste B, foi observado que o primeiro apresentou melhores resultados, sendo cerca de 23, 37 e 53% maior para as condições sem tampão, CaCO₃ e NaHCO₃, respectivamente.

Analisando separadamente os resultados obtidos no teste A (Figura 4.2), em que o pH inicial foi mais favorável à metanogênese, a taxa de produção de metano foi taxa menor para a condição sem a utilização de tampão, apresentando a maior concentração de ácido acético (dia 10; 2,700 mg.L⁻¹). A presença de CaCO₃ no meio foi, de alguma maneira, benéfica para o sistema, mesmo considerando a liberação lenta de alcalinidade, que no início do experimento era de 1728,0 mgCaCO₃.L⁻¹, a mesma concentração encontrada nos frascos sem a adição de tampão. Os frascos com a adição de bicarbonato de sódio como tampão, apresentaram melhor estabilidade durante o pico na concentração de ácido acético (1,916 mg.L⁻¹), provavelmente devido à maior concentração inicial de alcalinidade no meio (4519,8 mgCaCO₃.L⁻¹).

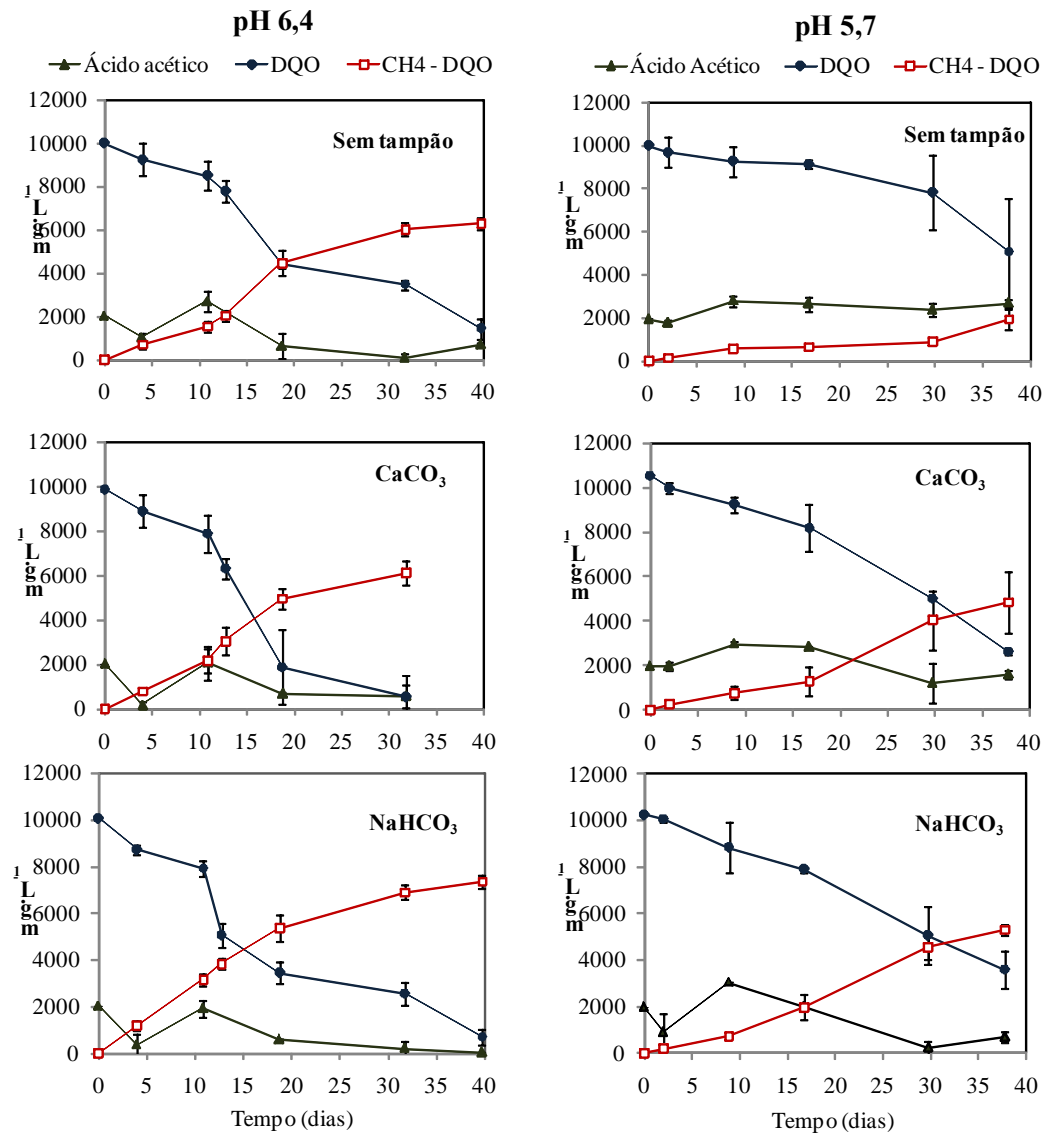


Figura 4-2: Concentrações de: ácido acético; DQO removida; e CH₄-DQO para os testes utilizando manipueira pré-tratada por fungos (pH 6,4 ó Teste A e pH 5,7 ó Teste B)

Todas as condições testadas apresentaram duas inclinações da reta para a produção de CH₄, exceto no teste A com MPTF e adição de bicarbonato de sódio como tampão, que apresentou uma inclinação estável durante o experimento (Figura 4.3). O tratamento fúngico aplicado à manipueira antes do teste de biodegradabilidade anaeróbia, mostrou-se benéfico. Apesar de no início do experimento, a manipueira com NaHCO₃ (controle) apresentar 2,6 vezes maior alcalinidade presente no meio, foi detectado o acúmulo de ácido acético até o 20º dia de experimento, semelhante ao teste com MPTF sem adição de tampão, que apresentou menor influência do tratamento fúngico. Como o teste controle teve alcalinidade suficiente, apresentou uma AME semelhante na segunda inclinação para a MPTF em pH 6,4. Para a manipueira, que é considerado um substrato de rápida

acidificação, devido a alta concentração de carboidratos em sua composição (Berg *et al.*, 2004), a hidrólise não deveria representar uma etapa limitante, mas ainda assim pode influenciar na taxa do processo. A concentração de ácido acético foi em torno de 2000 mg.L⁻¹ para a manipueira e MPTF, indicando que não existiu acidificação durante o tratamento por fungos, ou que os ácidos foram parcialmente consumidos (se produzidos). Nossos resultados mostraram que a cultura mista de fungos desempenhou um papel na hidrólise do efluente, que pode ter ocorrido parcialmente durante a etapa de pré-tratamento por fungos, transformando componentes iniciais da manipueira em compostos mais facilmente degradáveis.

É difícil comparar os resultados dos testes de biodegradabilidade com os existentes na literatura, onde os testes são realizados com proporções diferentes de substratos e biomassa, concentração inicial de substrato, tipos de tampão e qualidade do lodo, entre

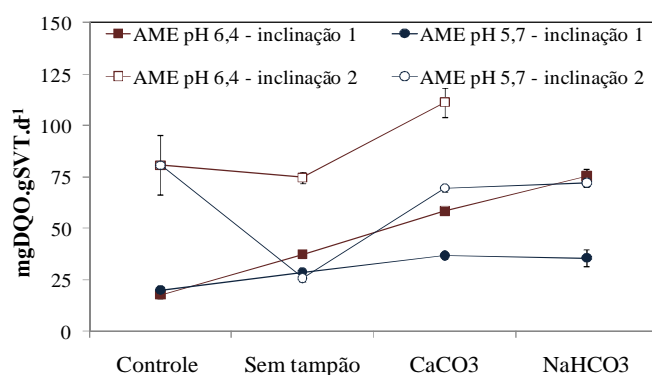


Figura 4-3: Atividade metanogênica específica AME das diferentes condições de tamponamento para o teste A(6,4) e teste B(5,7). A inclinação 1 foi calculada a partir do CH₄ produzido nos primeiros 15 dias. Os resultados são médias dos experimentos em triplicata.

outros. Annaschhatre e Amatya (2000) encontraram uma AME de 0.03 gCH₄-COD.gVS⁻¹.d⁻¹ para um lodo não adaptado usando manipueira como substrato em um meio tampão de fosfato, sendo o valor comparável à AME da primeira inclinação obtida no Teste A - MPTF sem tampão. Após a adaptação, a atividade da biomassa aumentou cerca de 10 vezes, o que é comparável com os resultados de Colin *et al.* (2006) que usaram biomassa cultivada em reator de fluxo

horizontal preenchido com bambu, tratando manipueira sem a adição de tampão.

O mecanismo pelo qual o pH aumenta durante a biodegradação por fungos não é completamente claro. De acordo com Singh (2006), pH levemente ácido é geralmente mais favorável para os fungos e pode evitar o crescimento bacteriano. Se for considerada a possibilidade da desassimilação do nitrato no meio durante a etapa de tratamento por fungos (Griffin, 1994) ou hidrólise do nitrogênio orgânico presente inicialmente na manipueira, pode-se supor que o nitrogênio total representa a concentração de amônia no meio. A Tabela 1 apresenta a concentração de nitrogênio total medido após a conclusão dos testes. Se for considerado, por exemplo, o teste com MPTF sem adição de tampão (teste A), com 637 mgNT.L⁻¹, esse valor corresponderia à adição de 0,11 g_{urea}.gDQO⁻¹, metade da concentração utilizada por Formagini *et al.* (2010) para estabilizar o pH em seus experimentos com vinhaça (16 gDQO.L⁻¹), usando a mesma biomassa nos experimentos.

4.5 Conclusões

O pré-tratamento com fungos da manipueira até o pH 6,4, favoreceu a estabilidade durante o teste de biodegradabilidade anaeróbia, mostrando a possibilidade da operação do sistema sem a adição de tampão, com pH neutro no final. Contudo, a presença de tampão adicional, elevou a taxa de formação de metano.

A aplicação de um pré-tratamento por fungos pode ser uma estratégia promissora para permitir a digestão anaeróbia de efluentes agroindustriais ricos em açúcares e carboidratos, que ainda dependem de difíceis estratégias de tratamento para aplicação em reatores em escala real. Estudos mais detalhados serão realizados para obter mais conhecimento sobre o papel da concentração de oxigênio, o mecanismo de elevação do pH e imobilização de biomassa, entre outros, para fornecer informações adicionais para o desenvolvimento tecnológico.

4.6 Referências

ABNT. (2003) NBR NM 53 - Agregado graúdo - determinação de massa específica, massa específica aparente e absorção de água. Rio de Janeiro: ABNT: 7.

Annaschhatre A.P. e Amatya P. L. (2000). UASB Treatment of tapioca starch wastewater. *Journal of Environmental Engineering* **126** (12), 1149-1152.

American Public Health Association (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Water Works Association, Washington - DC, USA.

Aquino S. F. e Chernicharo C. A. L. (2005). Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* **10** (2), 152 ó 161.

Berg J. M., Tymoczko J. L. e Stryer L. (2004). *Bioquímica*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Chernicharo C. A. d. L. (2007). *Reatores anaeróbios*. DESA-UFMG, Belo Horizonte - MG, Brasil.

Coulibaly L., Gourene G. e Agathos N.S. (2003). Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology* **2** (12):620-630.

Griffin D. H. (1994). *Fungal Physiology*. New York: Wiley ó Liss.

Formagini E. L., Santos L. da S., Paulo P. L. e Boncz M. Á. (2010). Methods for stabilization of pH during anaerobic digestion of vinasse: preliminary results obtained with

Capítulo 4- Digestão anaeróbia de manipueira pré-tratada por fungos.

urea dosing. In: *Proceeding of the 12th World Congress on Anaerobic Digestion*. Guadalajara, Mexico, IWA.

Harada H., Uemura S., Chen A.C. e Jayadevan J. (1996). Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor. *Bioresource Technology* **55**: 215-21.

Nagapadma Jasti N., Khanal S. K., Pometto A. L. e van Leeuwen J. (2006) Fungal treatment of corn processing wastewater in an attached growth system. *Water practice Technology* **1**(3):115-122.

Lopes M. S. da S., Oliveira P. C. C., Andrade M. V. F., Araújo R. dos S., Marinho G. e Rodrigues K. (2011). Removal of macronutrients from effluent of a cashew nut industry by using a batch aerobic reactor with fungal inoculums. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* **16**(1): 17-26.

Oliveira K. R. F. (2007). *Processos ecotecnológicos no tratamento de efluentes líquidos de fecularia*. Campo Grande. (Dissertação de Mestrado) ó Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS, Brasil.

Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* **22**: 189-259.

Pohland F. G. (1992). Anaerobic treatment: fundamental concepts, applications, and new horizons. *Design of anaerobic process for the treatment of industrial and municipal wastes*. In: MALINA, J. F.; POHLAND, F. G. (Ed.). USA: Technomic 7: 1 ó 40.

Ribas Döll M. M. e Foresti E. (2010). Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* **15**(3): 275-282.

Singh H. (2006). *Mycorremediation*. New Jersey: John Wiley & Sons.

Siqueira L. M., Barros A. R., Amorim E. L. C., Damianovic M. H. R. Z., Foresti E. e E. L. Silva (2008). Influence of increasing organic load on the treatment of sugar cane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). *IX Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia*, Isla de Pasqua, CL, IWA.

5

Conclusões gerais e recomendações

O estudo realizado nesta dissertação foi baseado no crescimento espontâneo de fungos em um reator tipo calha anaeróbia de fluxo horizontal tratando manipueira. O objetivo do estudo foi, em uma primeira etapa, isolar e identificar estes fungos, seguido da investigação das melhores condições para o desenvolvimento e eficiência destes, visando o uso no tratamento de efluentes de rápida acidificação.

Foram isoladas 32 morfoespécies, das quais quatro não foram identificadas. Entre as 28 restantes apenas três foram identificadas em nível de espécie, o restante foi identificado somente o gênero. Destes, onze eram *Aspergillus*, quatro *Scedosporium* e três *Paecilomyces*.

Os resultados demonstraram que os fungos desenvolvidos em um reator anaeróbio tipo calha horizontal eram aptos para realizar o tratamento de efluentes de rápida acidificação. A cultura mista de fungos mostrou habilidade em remover manipueira com um pH inicial de 4,5 e DQO de 15gDQO.L⁻¹, elevando o pH do meio a valores acima de 8,5, tanto em condições aeradas com em condições não aerada. Isto confirma as habilidades de adaptação em ambientes hostis a outros microrganismos, modificando o ambiente para benefício próprio, utilizando os compostos químicos e orgânicos presentes no meio, como fontes de energia para seu crescimento e reprodução.

Durante o teste de biodegradabilidade por fungos, foi demonstrado que na condição aerada as atividades metabólicas ocorreram em menor tempo e melhor eficiência, com 91% da DQO consumida, podendo ser usada como uma etapa única para o tratamento de manipueira, enquanto na condição não aerada, foi obtida uma remoção de 88% da DQO presente no meio, mostrando a primazia destes fungos em se desenvolver em ambientes com abundância de oxigênio livre. Contudo foi admitida a habilidade fúngica em crescer em ambientes com pouca disponibilidade de O₂, fazendo uso de vias metabólicas alternativas em resposta à pressão parcial de oxigênio do ambiente.

Os compostos de nitrogênio mostraram ter papel importante no tamponamento do sistema, considerando que nos experimentos realizados com substrato sintético, onde a fonte de nitrogênio era apenas de 72 mg.L⁻¹ presente na forma de NH₄Cl, o pH do meio não foi

recuperado, comparando-se com os altos valores de pH atingidos nos testes realizados com manipueira, os quais continham elevada quantidade de compostos de nitrogênio.

Nas condições experimentais testadas, a espuma de poliuretano não foi considerada adequada para o uso como meio suporte para o crescimento de biomassa fúngica, tornando se dispensável para este fim, pois não ocorreu aderência expressiva de biomassa fúngica na mesma.

Foi estudada a possibilidade de incluir uma etapa preliminar de tratamento por fungos à digestão anaeróbia buscando elevar o pH, visando tamponamento da manipueira. Removendo menos de 50% da DQO e elevando o pH a valores neutros, a condição não aerada foi a indicada para pré- tratamento à digestão anaeróbia. Os resultados após a digestão anaeróbia apontaram para a possibilidade da operação do sistema sem a adição de tampão, resultando em um pH final em torno de 7,0. Apresenta-se assim uma nova possibilidade para o tratamento de efluentes agroindustriais ricos em açúcares e carboidratos, os quais ainda dependem de estratégias de tratamento de difícil aplicação em reatores em escala plena, com a adição de agentes tamponantes para possibilitar a ação do consórcio microbiano da digestão anaeróbia.

Pode-se concluir que a cultura mista de fungos estudada foi eficiente no tratamento de manipueira e poderia ser aplicada, tanto como tratamento único, utilizando a condição aerada, quanto como uma etapa preliminar à digestão anaeróbia, utilizando a condição não aerada, tornando o pH do meio adequado ao consórcio microbiano do tratamento anaeróbio, viabilizando assim a produção de metano.

A partir dos resultados encontrados observou-se que estudos complementares são necessários, assim recomenda-se:

- ✓ Identificar em nível de espécies os fungos usados nos testes, para que posteriormente possa ser estudada a capacidade individual no tratamento de poluentes orgânicos;
- ✓ Investigar outros materiais para o uso como meio suporte para crescimento aderido de biomassa fúngica, quando tratando efluentes agroindustriais ricos em carboidratos;
- ✓ Investigar minuciosamente o papel da concentração de O₂ para o metabolismo dos fungos;
- ✓ Entender o real mecanismo de produção de NH₃ pelos fungos;
- ✓ Avaliar o desenvolvimento de fungos em pH alcalino.