

R E V I S T A

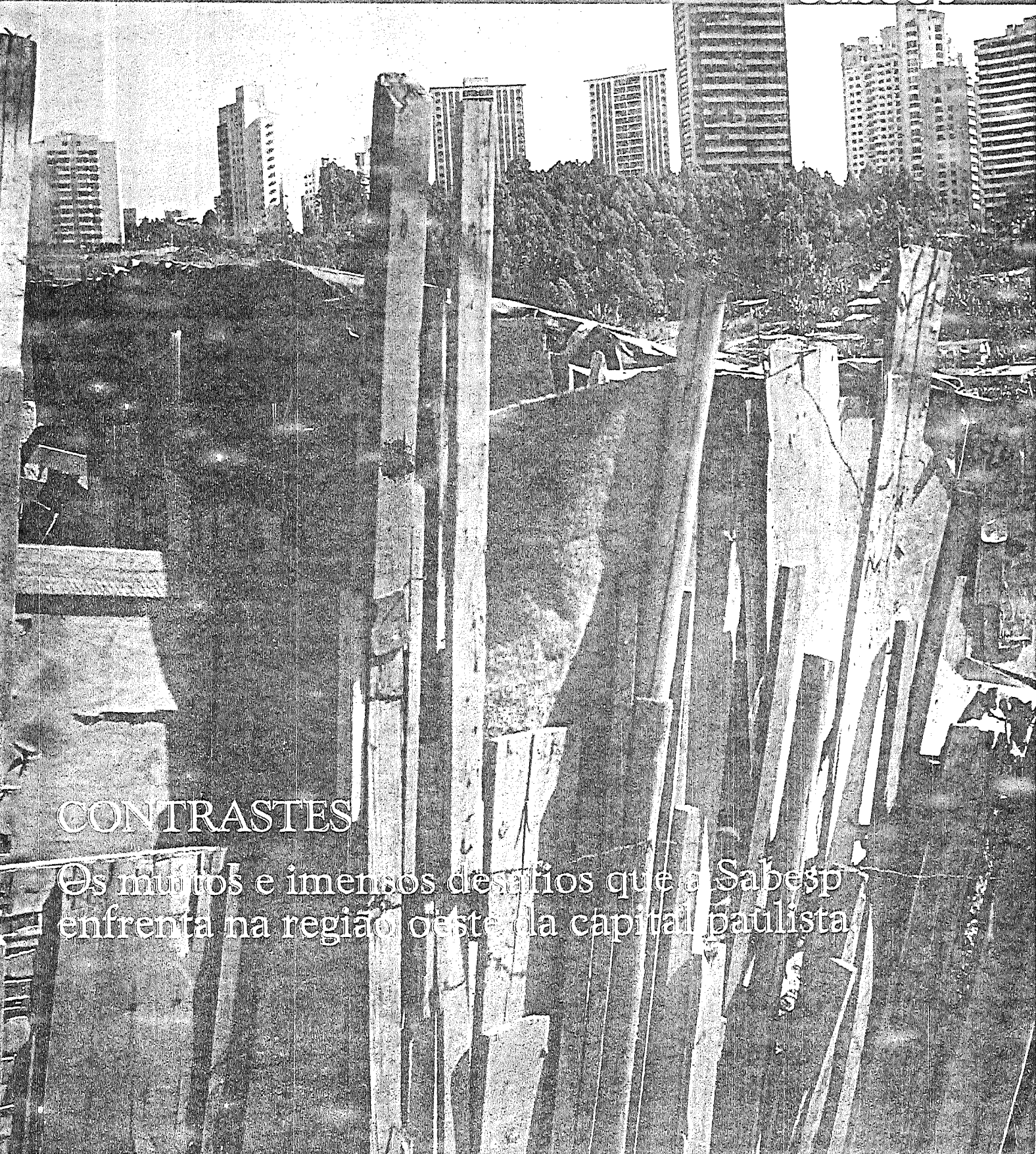
DAE

sabesp

SÃO PAULO SET/OUT 1990 VOL. 50
Nº 159 ISSN 0101 - 6040

CONTRASTES

Os muitos e imensos desafios que a Sabesp enfrenta na região oeste da capital paulista.



Determinação de matéria orgânica em águas residuárias (2)

CARLOS EDUARDO BLUNDI

Prof. Doutor do Depto. de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos-USP (Universidade de São Paulo)

JURANDYR POVINELLI

Prof. Titular do Depto. de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos-USP

CECILIA LALLUCE

Prof. Doutora do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus Araraquara

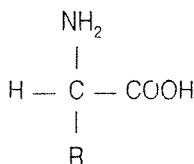
Este trabalho é continuação de número anterior da Revista DAE (n.º 157, pgs 205 a 217). Na primeira parte, os autores trataram de proteínas, carboidratos e lipídios contidos em amostras-controle preparadas em laboratório e em amostras de esgoto sanitário, com os resultados obtidos pelo método colorimétrico comparados com os valores de DQO e DBO. Agora, tratam de aminoácidos, matéria orgânica e biomassa.

AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos constituintes da matéria orgânica de águas residuárias resultam, geralmente, da hidrólise de proteínas presentes nesse meio. Por esse motivo, merecem estudo especial. O objetivo deste trabalho consiste na aplicação de um método relativamente rápido, econômico e preciso para a avaliação de aminoácidos totais em águas residuárias, bem como acompanhar seus níveis em ensaios referentes aos estudos de degradação de matéria orgânica em reatores.

AMINOÁCIDOS: CONCEITOS E OCORRÊNCIA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Aminoácidos, segundo Stryer (3), são compostos orgânicos de função mista que possuem um grupo funcional amino e o grupo funcional carboxílico, apresentando a seguinte fórmula estrutural:



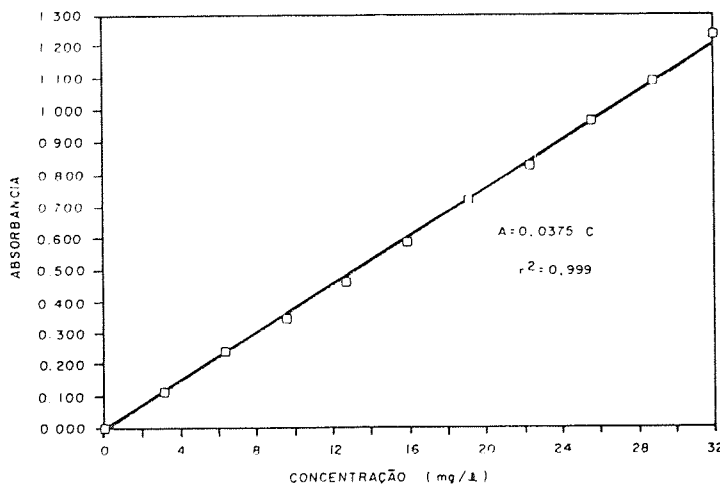
A condensação biológica de elevado número de moléculas de L aminoácidos dá origem às proteínas que são componentes importantes da matéria orgânica de águas residuárias. A caseína, presente em águas residuárias de laticínios, apresenta ácido glutâmico, leucina, prolina, lisina, serina, ácido aspártico, como principais componentes (2). As albuminas normalmente presentes em águas residuárias domésticas apresentam elevados teores de ácido glutâmico e leucina, sendo os níveis de ácido aspártico também significativos.

Nas águas residuárias, de um modo geral, o teor de aminoácidos livres é baixo, mas a presença deles nas proteínas justifica a sua determinação como subprodutos importantes da ação microbiana na fração orgânica nitrogenada.

METODOLOGIA Procedimentos gerais

O método utilizado para a determinação de aminoácidos foi o Método da Ninidrina, baseado na metodologia descrita por Yemm e Cocking (4). No presente trabalho, a curva padrão (Figura 1) foi obtida utilizando-se uma curva padrão mista contendo alanina (Merck), valina (Merck) e histidina (Merck) na proporção 1:1:1 (peso/volume)

Figura 1
Curva padrão para aminoácidos



Dois outros aminoácidos, serina (Merck) e ácido aspártico (Riedel de Haen), foram utilizados para a comparação entre o método proposto e os métodos usados pelos sanitaristas, ou seja DQO e DBO (Método das Diluições) descritos no Standard Methods (1). Foram estabelecidas, para esses aminoácidos, as seguintes correlações:

- concentração de aminoácido (gravimetria) x dosagem colorimétrica (curva padrão do Método da Ninidrina);
- concentração de aminoácido (gravimetria) x DQO;
- concentração de aminoácido (gravimetria) x DBO;

d) dosagem colorimétrica (curva padrão do Método da Ninidrina) x DQO;

e) dosagem colorimétrica (curva padrão do Método da Ninidrina) x DBO;

f) DQO x DBO.

Para a avaliação do grau de recuperação de aminoácido adicionado a um esgoto sanitário *in natura* e filtrado (Whatman n° 40, 8) foi preparado um "esgoto modificado" constituído pela adição dos seguintes compostos ao filtrado: soroalbumina bovina (900 mg/l), sacarose (500 mg/l), óleo de soja (200 mg/l), detergente em pó (200 mg/l) e ácido aspártico (200 mg/l). Devido a problemas de turbidez, o esgoto *in natura* e o esgoto modificado foram clarificados por nova filtração em filtro de nitrocelulose (Sartorius SM 11307.0,2) para as determinações colorimétricas. A diferença de concentração de aminoácido entre as amostras de esgoto modificado e esgoto *in natura* deve ser equivalente à concentração do aminoácido adicionado.

Método da ninidrina

O método da Ninidrina, como descrito por Yemm e Cocking (4), consiste na reação de um aminoácido com a ninidrina, originando um complexo de cor purpúrea característica, cuja absorbância foi medida a 570 nm num espectrofotômetro Micronal, modelo B-342.

Reagentes:

Tampão citrato, pH 5, 0,2 M, dissolve-se 21,008 g de ácido cítrico, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, em 200 ml de água destilada, adiciona-se 200 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e dilui-se a 500 ml com água destilada, armazena-se em geladeira com algumas gotas de timol.

Cianeto de potássio, 0,01 M: dissolve-se 0,1628 g de cianeto de potássio (KCN) em água destilada e dilui-se a 250 ml (estável por 3 meses à temperatura ambiente).

Solução de cianeto de potássio em metil-celossolve: dilui-se 5 ml da solução de cianeto de potássio 0,01 M a 250 ml com metil-celossolve (estável por 1 mês à temperatura ambiente).

Solução de ninidrina em metil-celossolve: prepara-se uma solução 5% (peso/volume) de ninidrina em metil-celossolve estável por 6 meses à temperatura ambiente).

Solução de cianeto de potássio e ninidrina em metil-celossolve: mistura-se 50 ml da solução de ninidrina em metil-celossolve com 250 ml da solução de cianeto de potássio em metil-celossolve, armazena-se uma noite (estável por uma semana, em frasco fechado, à temperatura ambiente).

Procedimento:

A execução do método consiste nas seguintes etapas: mistura-se 0,5 ml do tampão citrato, pH 5, 0,2 M, com 1 ml de uma solução contendo aminoácido, adiciona-se 1,2 ml da solução de cianeto de potássio e ninidrina em metil-celossolve à amostra, aquece-se a mistura por 15 minutos a 100°C, esfria-se por 5 minutos em água corrente, adiciona-se 1 ml de solução de etanol em água a 60% (volume/volume), agita-se e procede-se a leituras num espectrofotômetro a 570 nm. A leitura deve ser feita contra um branco, sem aminoácidos, que contém 1,5 ml de tampão citrato, 1,2 ml da solução de cianeto de potássio e ninidrina em metil-celossolve e 1 ml da solução de etanol a 60% seguindo-se os mesmos procedimentos descritos acima.

RESULTADOS

Amostras controles preparadas em laboratórios: serina e ácido aspártico

Os resultados (Figura 2 a 13) referentes à determinação de aminoácidos são apresentados a seguir, mostrando as diversas correlações descritas na metodologia, para os valores das concentrações de aminoácidos

obtidos por gravimetria (C), dosagens colorimétrica (D), DQO e DBO para amostras dos dois aminoácidos estudados separadamente. Nas figuras estão indicadas, ainda, as equações das curvas, ajustadas pelo método dos mínimos quadrados, e os valores obtidos para os coeficientes de correlação.

Figura 2

Correlação entre dosagem colorimétrica e concentração obtida por gravimetria de serina

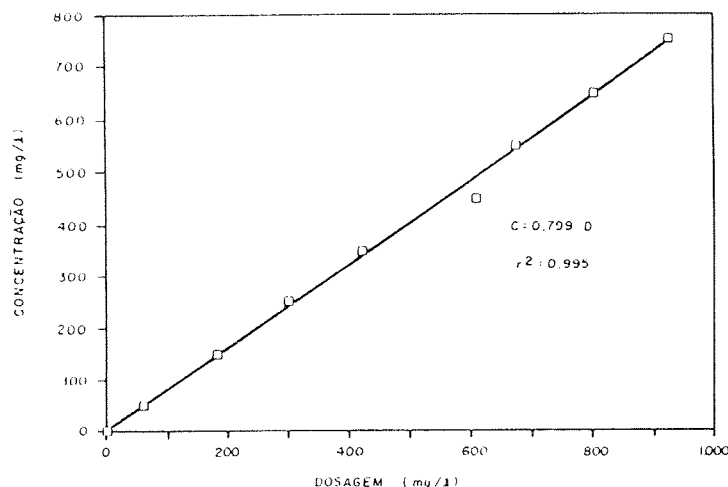


Figura 3

Correlação entre dosagem colorimétrica e concentração obtida por gravimetria de ácido aspártico

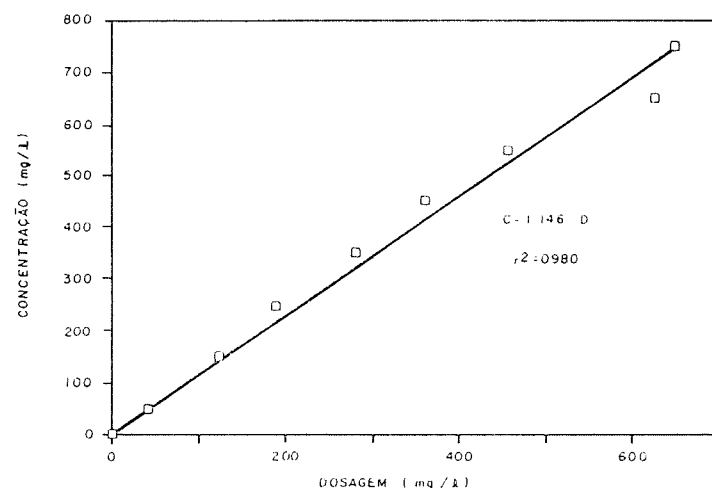


Figura 4

Correlação entre DQO e concentração obtida por gravimetria de serina

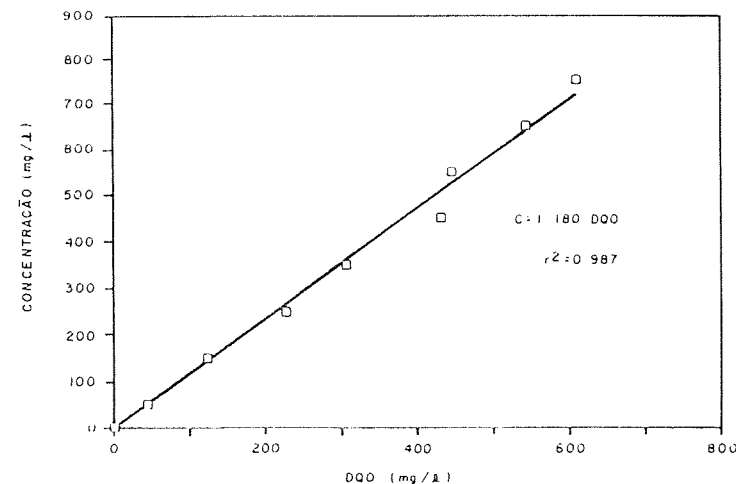


Figura 5
Correlação entre DQO e concentração obtida por gravimetria de ácido aspártico

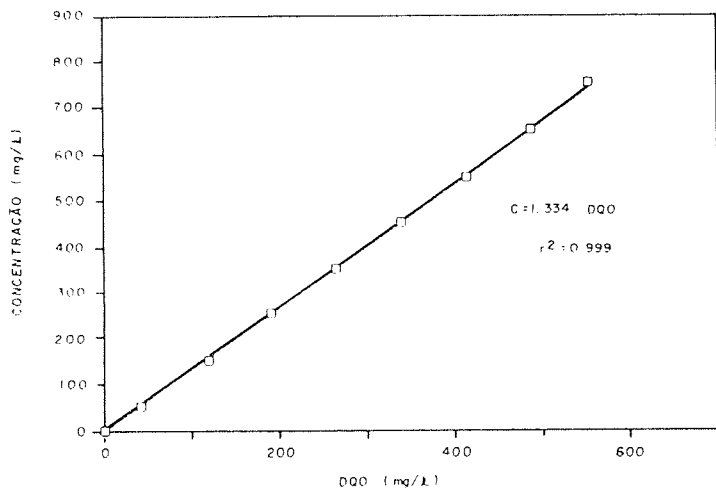


Figura 8
Correlação entre dosagem colorimétrica e DQO de serina

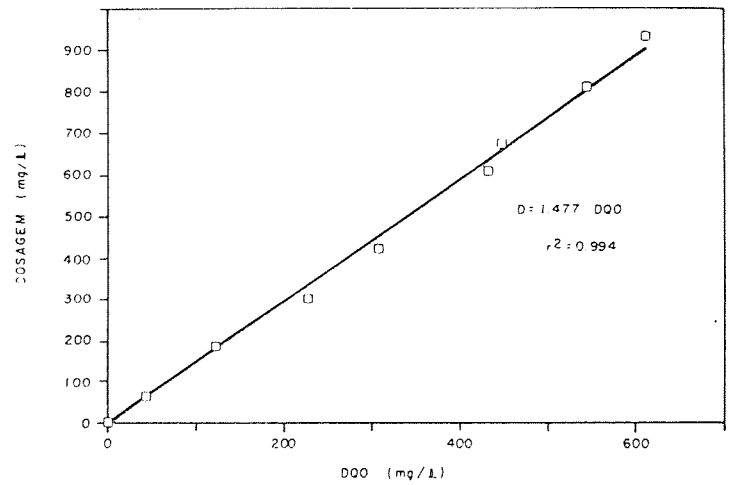


Figura 6
Correlação entre DBO e concentração obtida por gravimetria de serina

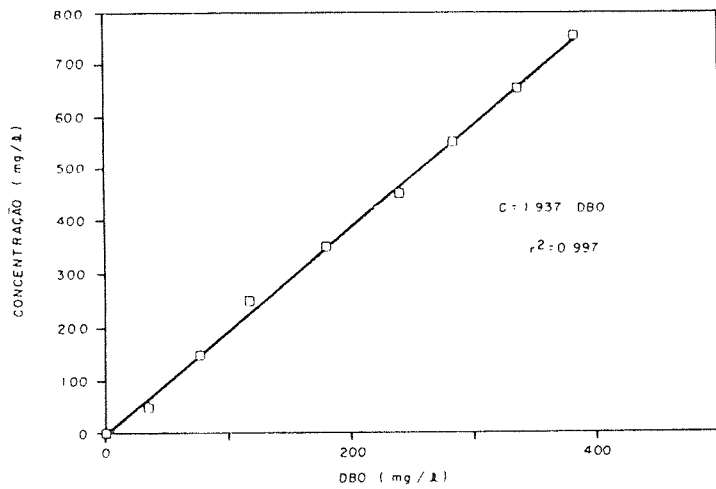


Figura 9
Correlação entre dosagem colorimétrica e DQO de ácido aspártico

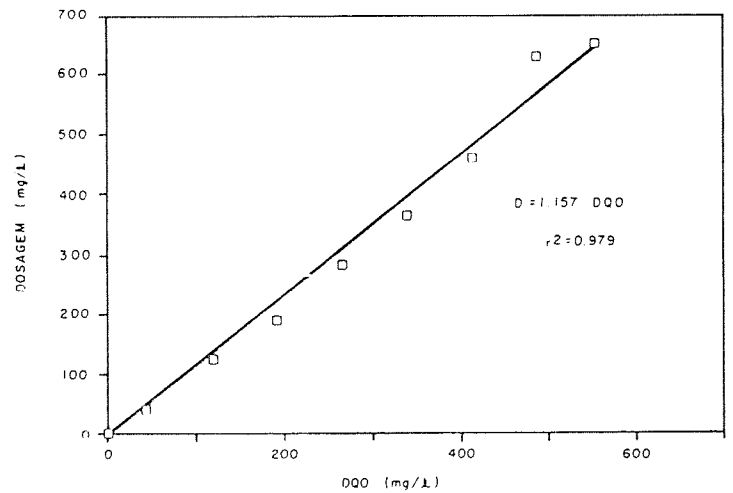


Figura 7
Correlação entre DBO e concentração obtida por gravimetria de ácido aspártico

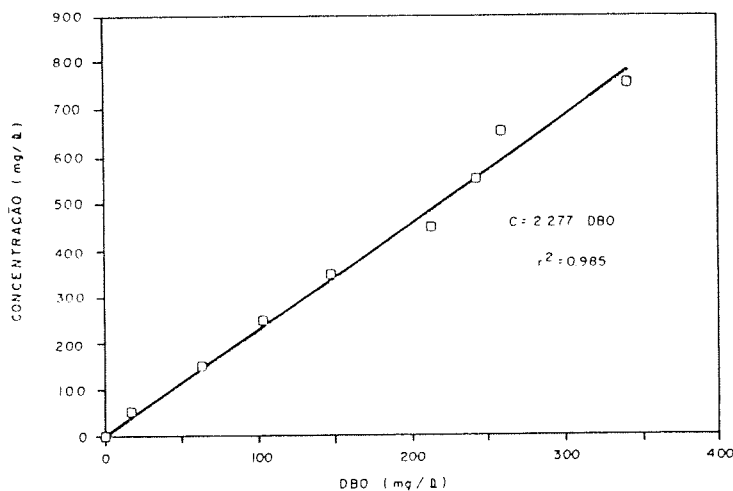


Figura 10
Correlação entre dosagem colorimétrica e DBO de serina

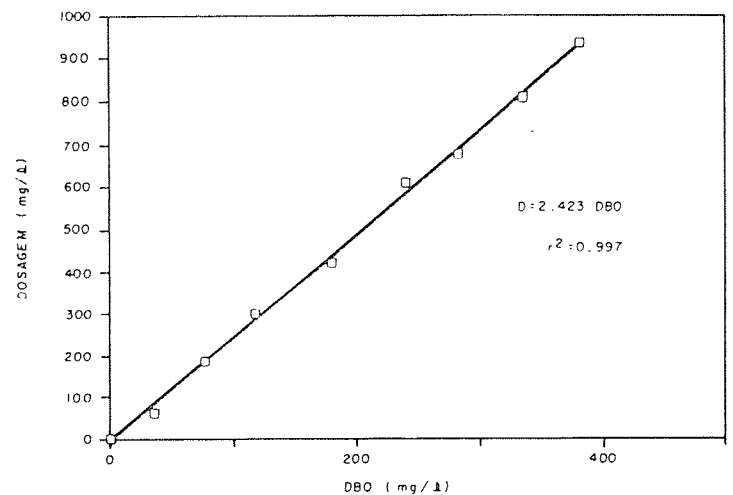


Figura 11
Correlação entre dosagem colorimétrica e DBO de ácido aspártico

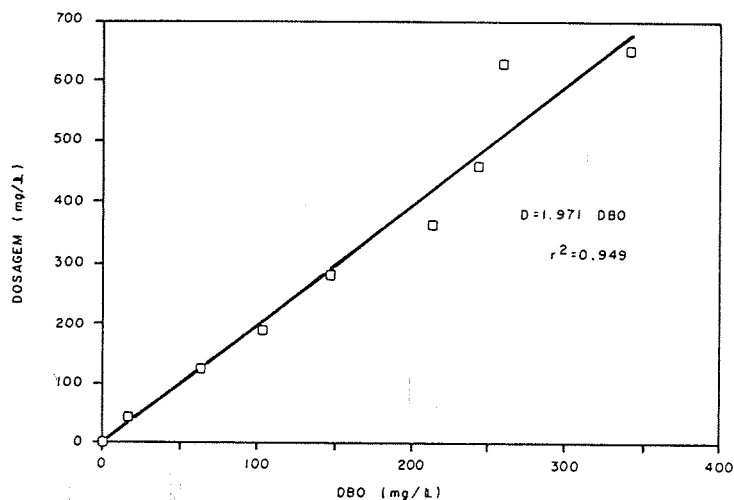


Figura 12
Correlação entre DQO e DBO de serina

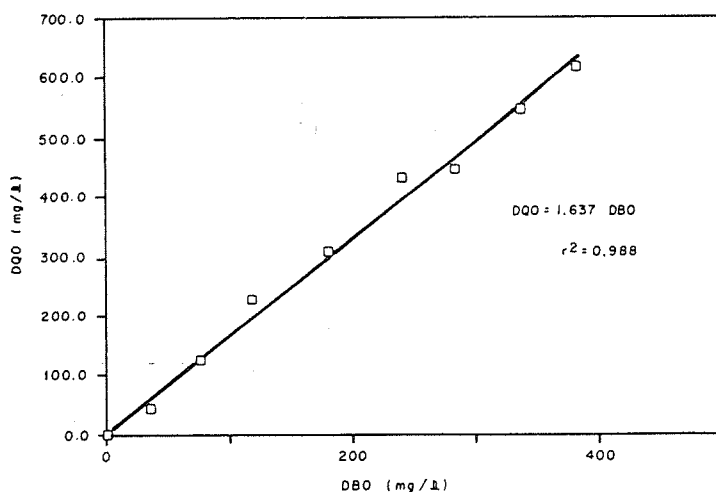
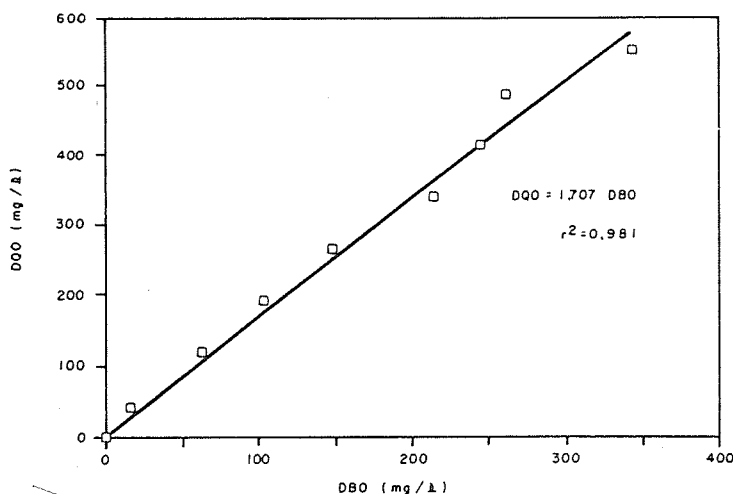


Figura 13
Correlação entre DQO e DBO de ácido aspártico



Amostras de esgoto sanitário

A recuperação da quantidade de aminoácido (ácido aspártico, adicionada ao esgoto sanitário, empregando-se o Método da Ninidrina, está descrita na Tabela I:

Tabela I
Recuperação de ácido aspártico adicionado ao esgoto sanitário^a

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO		RECUPERAÇÃO		
	C_a (mg/l)	D (mg/l)	ΔD (mg/l)	ΔD_c (mg/l)	$C_a / \Delta D_c$
ESGOTO	-	78	-	-	-
ESGOTO MODIFICADO	200	317	239	274	1,37
ESGOTO CLARIFICADO	-	60	-	-	-
ESGOTO MODIFICADO E CLARIFICADO	200	242	182	209	1,05

a

significado dos símbolos

C_a : concentração de ácido aspártico adicionado (gravimetria)

D : concentração pelo Método de Ninidrina

Δ : D do esgoto modificado — D do esgoto

Δ_c : valores de D corrigidos conforme Figura 3

Os resultados de DQO e de $\text{DBO}_{5,20}$ para as amostras estudadas são mostradas na Tabela II:

Tabela II
Resultado de DQO, $\text{DBO}_{5,20}$ e recuperação de matéria orgânica adicionada ao esgoto sanitário^a

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO			RECUPERAÇÃO			
	C_T (mg/l)	DQO (mg/l)	$\text{DBO}_{5,20}$ (mg/l)	ΔDQO (mg/l)	$\Delta \text{DQO}_{5,20}$ (mg/l)	$\Delta \text{DQO} / C_T$	$\Delta \text{DBO}_{5,20} / C_T$
ESGOTO	-	325	180	-	-	-	-
ESGOTO MODIFICADO	2 000	2 559	1 571	2 234	1 391	1,12	0,70

a

significado dos símbolos

C_T : concentração de matéria orgânica total adicionada

ΔDQO : DQO do esgoto modificado — DQO do esgoto

$\Delta \text{BO}_{5,20}$: $\text{DBO}_{5,20}$ do esgoto modificado — $\text{DBO}_{5,20}$ do esgoto

A Tabela III apresenta as correlações obtidas entre os valores de ácido aspártico, recuperado do esgoto pelo Método da Ninidrina, e a matéria orgânica total adicionada, determinada por DQO e $\text{DBO}_{5,20}$.

Tabela III
Comparação das correlações entre a concentração de Ácido determinada pelo método da Ninidrina e a matéria orgânica total por gravimetria, DQO e $\text{DBO}_{5,20}$

C_a / C_T	$\Delta D_c / C_T$	$\Delta D_c / \Delta \text{DQO}$	$\Delta D_c / \Delta \text{DBO}_{5,20}$
0.100	0.105	0.094	0.150

Os resultados das dosagens colorimétricas e das concentrações obtidas por gravimetria variam com o tipo de aminoácido, sendo melhores as correlações encontradas para o ácido aspártico do que para a serina. Observa-se, portanto, a dificuldade de se adotar uma curva padrão, que referencie adequadamente qualquer um deles. Os valores do DQO, tanto para as amostras controles de serina como para as de ácido aspártico, são relativamente próximos dos valores das dosagens colorimétricas. Já os resultados de DBO, das mesmas, encontram-se mais distanciados.

Nas amostras de esgoto modificado observa-se que o Método da Ninidrina pode ser utilizado para a recuperação de aminoácidos específicos adicionados à fração solúvel do esgoto sanitário, fornecendo bons resultados, sem interferências aparentes em relação aos outros componentes orgânicos presentes. A relação de 1,05 obtida entre o ácido aspártico recuperado e o adicionado ao esgoto, mostrada na Tabela I, comprova a eficiência do método.

Apesar das diferenças que o método colorimétrico apresenta entre os aminoácidos, a Tabela III mostra que, utilizando a mistura de alanina, valina e histidina como padrão, é possível empregá-lo para a avaliação de ácido aspártico em esgoto e certamente de outros aminoácidos que apresentem curvas para padrões com inclinações próximas. Métodos menos específicos em relação ao tipo de aminoácidos estão sendo considerados para a determinação de aminoácidos totais.

A mesma Tabela III mostra, ainda, a proximidade de C_a/C_T com $\Delta D_c/\Delta DQO$, evidenciando a eficiência do teste de DQO na determinação de matéria orgânica total no caso considerado.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — American Public Health Association. American Water Works Association. Water Pollution Control Federation — *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 16ª ed. Washington, American Public Association, 1985.
- 2 — HAWK, P.B. et alii. *Practical Physiological Chemistry*. 12ª ed. N.Y., The Blakiston Company, 1951. 1322 p.
- 3 — Stryner, L. *Bioquímica* Barcelona, Editorial Reverté S.A., 1979. 875p.
- 4 — Yemm, E.W. & Cocking, F.C. Determination of Amino-acids with Ninhydrin. *The Analyst*, 80: 209-213, 1954.

MATÉRIA ORGÂNICA

A matéria orgânica presente em águas residuárias é normalmente determinada através da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Apesar desses métodos estarem sujeitos a imprecisões e limitações, que condicionam seu uso, são ainda os mais comumente empregados nessas determinações. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de se proceder a um estudo mais detalhado relativo à determinação de matéria orgânica em águas residuárias, pois muitos dos parâmetros de projetos de unidades de tratamento dependem desse valor. Tal conclusão incentivou a proposição deste trabalho que reúne os seguintes objetivos:

— propor uma metodologia alternativa em relação a usualmente empregada para a determinação de matéria orgânica em águas residuárias, visando economia, rapidez e precisão,

— comparar os resultados obtidos entre os métodos propostos e os métodos usuais de DQO e DBO.

Essa metodologia alternativa consiste no emprego de métodos colorimétricos que permitem a dosagem de proteínas, carboidratos, lipídios, detergentes e aminoácidos que normalmente compõem as águas residuárias, mais notadamente as de origem doméstica.

Os principais compostos orgânicos encontrados em águas residuárias são: carboidratos, proteínas, aminoácidos e lipídios. Outros compostos orgânicos, como uréia, surfactantes, fenóis, pesticidas, também podem estar presentes, porém em concentrações menores. Os constituintes orgânicos são tanto de origem animal como vegetal e podem resultar de processos de síntese ou de decomposição de outros produtos existentes no meio. As águas residuárias podem ainda conter certos compostos bioquímicos, como enzimas, coenzimas, vitaminas, ATP, ácidos nucleicos que normalmente não se encontram livres nesse meio.

Metcalfe e Eddy (4) citam que cerca de 75% dos sólidos suspensos e 40% dos sólidos filtráveis, em águas residuárias, são de origem orgânica. O esgoto sanitário, segundo Tebbutt (6), apresenta 99,9% de água e 0,1% de sólidos. Esses sólidos contêm em média 70% de matéria orgânica e 30% de matéria inorgânica. Hunter e Heukelekian (2) obtiveram resultados nos quais a fração particulada do esgoto sanitário estudado contém aproximadamente 80% de matéria orgânica e a fração solúvel contém aproximadamente 30%. Concluíram também que aproximadamente 64% dos sólidos totais provêm da fração solúvel do esgoto e que 40% da matéria orgânica total são provenientes dessa fração.

METODOLOGIA

A matéria orgânica presente em águas residuárias é determinada, normalmente, através dos testes de DQO e de DBO, que são os ensaios tradicionais utilizados em Saneamento. Devido às limitações desses testes, propõe-se métodos alternativos colorimétricos, utilizados e Bioquímica, para a dosagem de proteínas, carboidratos, lipídios, detergentes e aminoácidos, uma vez que esses compostos são os principais constituintes da matéria orgânica das águas residuárias.

Para verificar a eficiência dos métodos colorimétricos empregados, preparou-se, a partir de um esgoto sanitário *in natura* filtrado (filtro Whatman 40, 8µ), um "esgoto modificado" constituído pela adição dos seguintes compostos: soroalbumina bovina (900 mg/l), sacarose (500 mg/l), óleo de soja (200 mg/l) detergente em pó (200 mg/l) e ácido aspártico (200 mg/l). A medida de cada substância adicionada foi feita através de dosagem por métodos colorimétricos empregados no esgoto modificado e no esgoto *in natura* filtrado. No caso de proteínas, carboidratos e aminoácidos, foi necessário, antes de suas dosagens, filtrar novamente as amostras de esgoto em filtros de nitrocelulose (Sartorius, SM 11307, 0,2 µ) para eliminar os efeitos de turbidez remanescente. A diferença de concentração obtida entre as amostras de esgoto modificado e esgoto *in natura* filtrado deve ser equivalente à concentração das substâncias adicionadas. A concentração de matéria orgânica total adicionada foi comparada com a concentração da matéria orgânica total recuperada através dos resultados obtidos pelos métodos colorimétricos, pela DQO e pela DBO.

Proteínas foram determinadas através do Método do Micro-Biureto, segundo Itzhaki e Gill (3), carboidratos através do Método da Antrona, segundo Weiner (7), lipídios através do Método da Sulfofosovanilina, segundo Postma e Stroes (5), detergentes através do Método do Azul de Metileno, segundo Standard Methods (1) e aminoácidos através do Método da Ninidrina, segundo Yemm e Cocking (8). Os ensaios de DQO e DBO (Método das Diluições), utilizados neste trabalho, encontram-se descritos no Standard Methods (1).

RESULTADOS

A recuperação da matéria orgânica adicionada ao esgoto sanitário *in natura* filtrado é mostrado na Tabela I.

Tabela I
Resultados da recuperação da matéria orgânica adicionada ao esgoto sanitário através de dosagens colorimétricas ^a

	SOROAL - BUMINA	SACA - ROSE	ÓLEO DE SOJA	DETER - GENTE	ÁCIDO ASPÁRTICO	TOTAL
D	918	492	208	209	209	2036
C	900	500	200	200	200	2000
D/C	1,02	0,98	1,04	1,05	1,05	1,02

a
Significado dos símbolos:
D: concentração, em mg/l, obtida por dosagem colorimétrica
C: concentração, em mg/l, obtida por gravimetria

A Tabela II apresenta os resultados de dosagens colorimétricas, DQO e DBO relativos à matéria orgânica total recuperada do esgoto sanitário in natura filtrado.

Tabela II
Resultados de dosagens, DQO e DBO da matéria orgânica total recuperada do esgoto sanitário

MATÉRIA ORGÂNICA RECUPERADA	mg / l
DETERMINADA PELOS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS	2036
DETERMINADA POR DQO	2234
DETERMINADA POR DBO	1391
MATÉRIA ORGÂNICA ADICIONADA	mg / l
DETERMINADA POR GRAVIMETRIA	2000

A Tabela III mostra as diversas correlações existentes entre as determinações descritas na Tabela II.

Tabela III
Correlações entre as medidas da matéria orgânica total adicionada ao esgoto sanitário

D / C	DQO / C	DBO / C	DQO / D	DBO / D	DBO / DQO
1,02	1,12	0,70	1,10	0,68	0,62

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Observa-se através da Tabela II que o valor da matéria orgânica total acrescentada ao esgoto foi de 2000 mg/l e o valor recuperado através dos métodos colorimétricos foi de 2036 mg/l, correspondendo à relação de 1,02 entre ambos, indicando, praticamente, total recuperação do material adicionado. A relação DQO/C mostra que a medida de DQO se aproxima bastante do valor da concentração da matéria orgânica adicionada, apresentando também um valor próximo da relação DQO/D. O valor da DBO da matéria orgânica recuperada é menor que o da matéria orgânica realmente adicionada, apresentando uma relação igual a 0,70. Observa-se também que valores próximos a esses foram obtidos para as relações DBO/D e DBO/DQO, ou sejam 0,68 e 0,62, respectivamente, mostrando, dessa forma, a coerência dos resultados conseguidos.

Conclui-se, através desses ensaios preliminares, que os métodos colorimétricos podem ser utilizados como uma metodologia alternativa para a determinação da matéria orgânica. A execução desses ensaios é rápida, exceto a determinação de detergentes que é, relativamente, um pouco mais demorada. Porém, desejando-se medir a matéria orgânica somente em termos de proteínas, carboidratos e lipídios, a metodologia torna-se mais rápida. Portanto, a utilização desses métodos está condicionada a limitações que dependem das necessidades e exigências requeridas pelo seu emprego.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — American Public Health Association. American Water Works Association. Water Pollution Control Federation — *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 16^a ed. Washington. American Public Association, 1985.
- 2 — Hunter, J.V. & Heukelekian, H. The Composition of Domestic Sewage Fractions. *Journal Water Pollution Control Federation*, 37(8):1142-1163, August, 1965.
- 3 — Itzhaki, R.F. & Gill, D.M. A Micro-Biuret Method for Estimating Proteins. *Anal. Biochem.*, 9:401-410, 1964.
- 4 — Metcalf & Eddy, Inc. Wastewater Engineering: *Treatment, Disposal, Reuse* 2^a ed. U.S.A., McGraw-Hill, 1979. 920p.
- 5 — Postma, T. & Stroes, J.A.P. Lipid Screening in Clinical Chemistry. *Clin. Chim. Acta*, 22:569-578, 1968.
- 6 — Tebbutt, T.H.Y. *Principles of Water Quality Control*. 2^a ed. Oxford, Pergamon Press, 1977. 195p.
- 7 — Weiner, J. Determination of Total Carbohydrate in Beer. *J. Inst. Brew.*, 84:222-223, 1978.
- 8 — Yemm, E.W. & Cocking, E.C. Determination of Amino-acids with Ninhydrin. *The Analyst*, 80:209-213, 1954.

BIOMASSA

A determinação dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) é um procedimento bastante usual em Laboratórios de Saneamento e os resultados desse método representam, o valor da biomassa presente em águas residuárias. O objetivo deste trabalho consiste no emprego de um método colorimétrico alternativo em relação aos SSV, visando economia e rapidez na obtenção dos resultados.

CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOMASSA

Biomassa pode ser definida como a massa resultante de uma atividade biológica.

A importância da determinação da biomassa presente nas águas residuárias deve-se ao fato de que tal avaliação constitui-se de um parâmetro fundamental para o estudo da cinética química dos processos de tratamento de águas residuárias.

A biomassa pode ser determinada através de vários métodos e todos eles apresentam interferências e limitações que implicam uma análise criteriosa aos resultados obtidos. Os principais métodos são baseados em medidas de massa, medidas de volume, medidas de um componente celular, medidas de crescimento, medidas de taxas metabólicas, medidas de turbidez, contagens de células ou organelas.

A escolha do método a ser empregado depende das propriedades e natureza da biomassa e do meio de cultura no qual ela se encontra. O tempo de execução, a sensibilidade e a precisão de cada determinação varia de método para método e são fatores fundamentais para a adoção do mesmo. A Tabela I mostra a comparação dos métodos em relação à sensibilidade dos mesmos.

Tabela I
Comparação de métodos empregados na determinação de biomassa e sua sensibilidade

MÉTODO	MASSA SECA MÍNIMA DE BACTÉRIA REQUERIDA PARA DETERMINAÇÃO COM ERRO MENOR QUE 2% (mg/L)
MASSA SECA	50
DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (BIURETO)	1
DETERMINAÇÃO DE DNA	1
DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (FOLIN-CIOCALTEU)	10 - 1
TURBIDEZ	10 - 1
CONTAGEM CELULAR	10 - 5

Fonte: Pirt (2)

METODOLOGIA

A medida de biomassa das amostras testadas foi realizada através da determinação dos Sólidos Suspensos Voláteis (1) e do Método do Biureto (3) que dosa a quantidade de proteínas libertadas pela hidrólise alcalina do material constituinte dos microorganismos.

Essas medidas foram realizadas em amostras de cultura pura de *Citrobacter freundii* e em amostras de cultura mista obtidas de um reator descontínuo utilizado para a degradação de lactose.

Amostras de cultura pura

A cultura de *Citrobacter freundii* foi crescida de acordo com as técnicas usuais empregadas em Microbiologia e a suspensão resultante de 13,46 mg/l (massa seca) obtida foi utilizada como solução estoque para a determinação da curva padrão que relacionou massa seca microbiana com a absorbância fornecida pelo Método do Biureto, conforme mostra a Figura 1.

Dez diluições diferentes, a partir da solução estoque, foram também preparadas e ensaiadas pelo Método do Biureto e dos SSV para o estabelecimento da correlação entre os métodos.

Amostras de cultura mistas

As medidas de biomassa, através do Método do Biureto e dos SSV das amostras de cultura mista, originárias de um reator aeróbio de degradação de lactose, inoculado com esgoto sanitário, constituíram os elementos necessários para a determinação da curva de crescimento de microorganismos desse sistema. A amostra coletada no 8º dia de operação do reator e a amostra coletada no 23º dia foram utilizadas para a obtenção de duas curvas padrões que relacionaram absorbância, pelo Método do Biureto, com as massas fornecidas pelos SSV, conforme mostram as Figuras 2 e 3.

Figura 1
Curva padrão de *Citrobacter freundii*

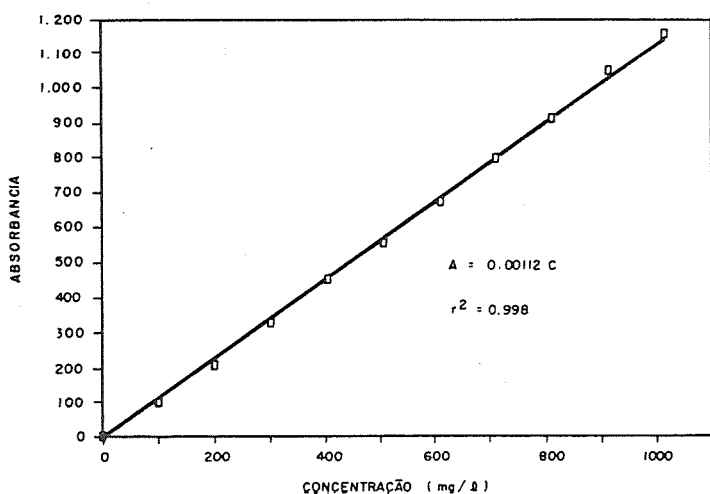


Figura 2
Curva padrão de biomassa de cultura da amostra do 8º dia de operação do reator

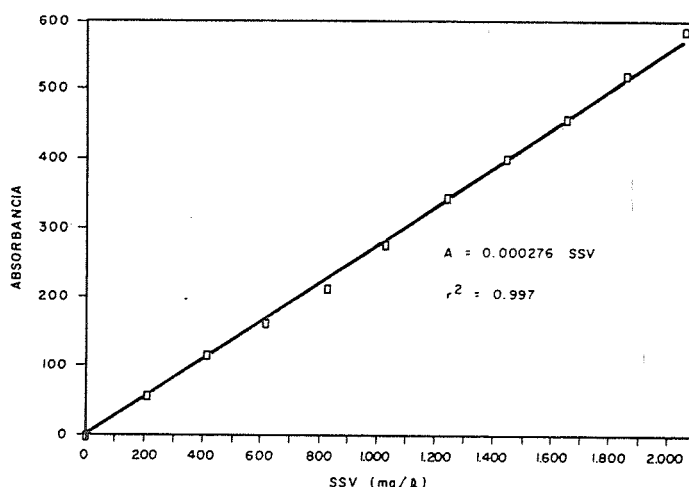
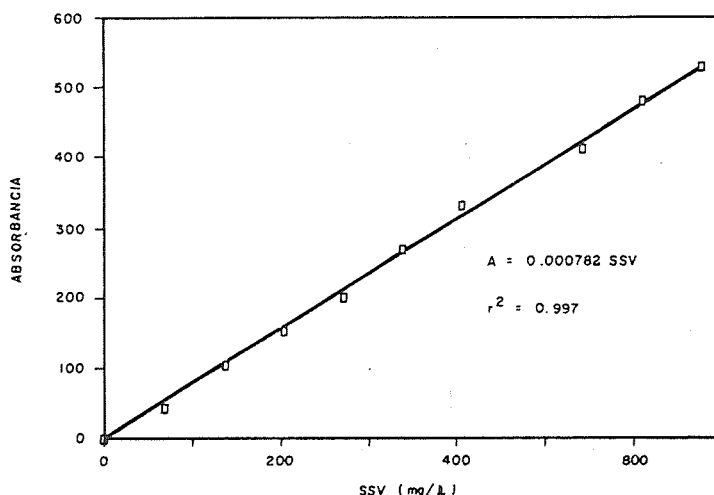


Figura 3
Curva padrão de biomassa de cultura da amostra do 23º dia de operação do reator



Método do biureto para determinação de biomassa

O método desenvolvido por Stickland (3) consiste na adição de hidróxido de sódio em amostras que contêm suspensões microbianas. O excesso de hidróxido de cobre é removido por centrifugação e a absorbância do sobrenadante, que apresenta a cor violeta, é medida a 310 nm. O espectrofotômetro utilizado para essas medidas foi Beckman, modelo DU-25. A intensidade da cor desenvolvida no ensaio é proporcional à quantidade de biomassa presente na amostra.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio, 20%: dissolve-se 20g de NaOH em 100 ml de água destilada.

Solução de sulfato de cobre, 25%: dissolve-se 25g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água destilada.

Procedimento

Adiciona-se a 3,3 ml da suspensão aquosa de células lavadas, 0,6 ml da solução de hidróxido de sódio 20% e aquece-se a mistura em um banho de água à ebulição, durante 15 minutos. Esfria-se a amostra à temperatura ambiente, adiciona-se 0,1 ml da solução de sulfato de cobre 25% e agita-se a mistura. Após 5 minutos, centrifuga-se essa

suspensão a 8500 rpm por 15 minutos. Decanta-se o sobrenadante e determina-se sua absorbância a 310 nm. O branco é preparado da mesma forma, utilizando-se água destilada no lugar da suspensão de células.

RESULTADOS

Biomassa de cultura pura

As Figuras 4, 5 e 6 apresentam as curvas que mostram as correlações entre concentração e dosagem pelo Biureto, concentração e SSV, dosagem pelo Biureto e SSV, respectivamente, para as suspensões de culturas puras de *Citrobacter freundii* testados.

Figura 4
Correlação entre dosagem pelo Biureto e concentração das suspensões de *Citrobacter freundii*

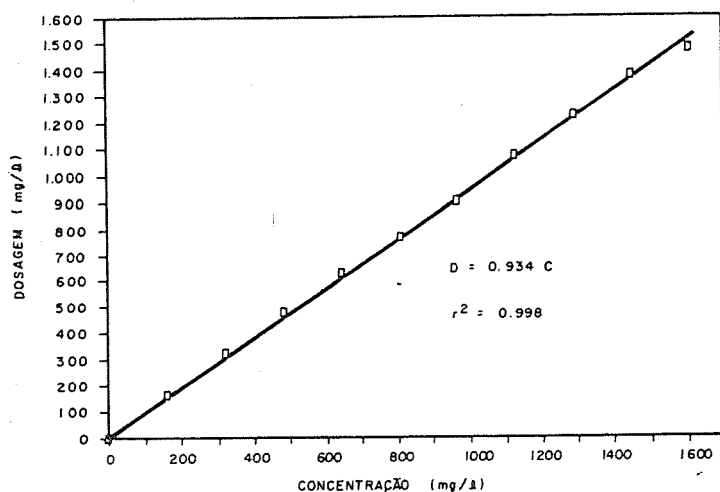


Figura 5
Correlação entre SSV e concentração das suspensões de *Citrobacter freundii*

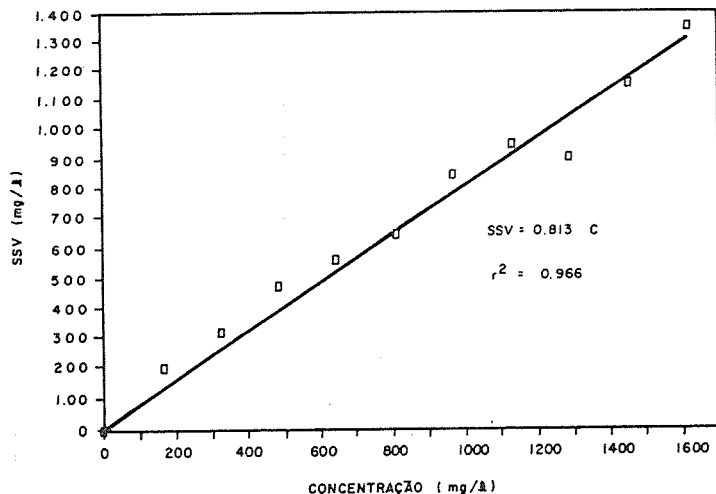
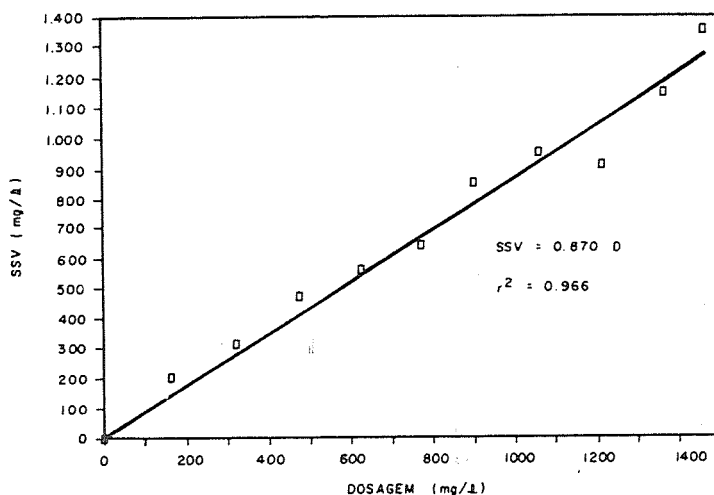


Figura 6
Correlação entre dosagem pelo Biureto e SSV das suspensões de *Citrobacter freundii*



Biomassa em cultura mista

A Figura 7 mostra a variação da concentração de biomassa em função do tempo, para o reator estudado, através de medidas de SSV e de dosagens pelo Método do Biureto. Neste estudo, as medidas de dosagens foram referenciadas a duas curvas padrões. Até o 11º dia, as dosagens foram referenciadas à curva padrão obtida da amostra do 8º dia de operação do reator (Figura 2), e do 12º ao 38º dia, as dosagens foram referenciadas à curva padrão obtida através da amostra do 23º dia de operação do reator (Figura 3).

A Figura 8, apresenta a correlação entre dosagem pelo Biureto e SSV para as amostras do reator.

Figura 8
Correlação entre dosagem de biomassa pelo Método do Biureto e SSV de cultura mista do reator.

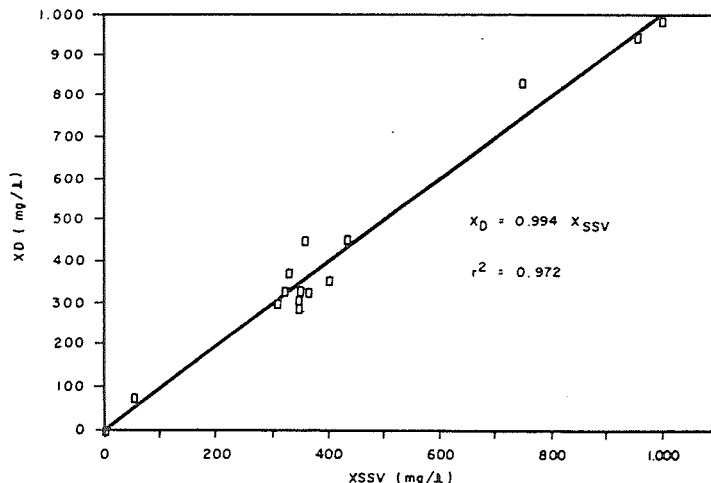
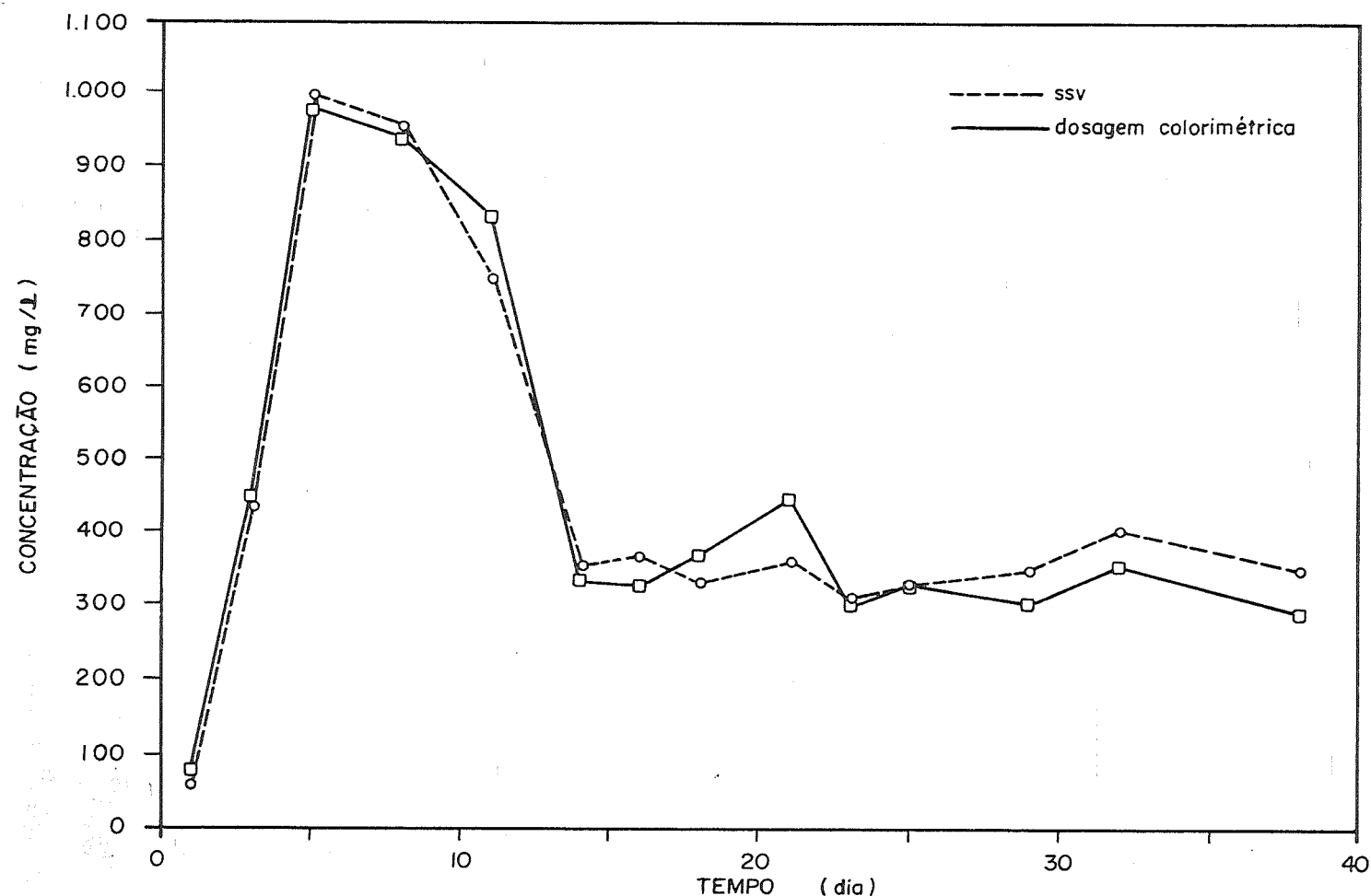


Figura 7 Variação de biomassa em função do tempo para o reator estudado.



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Observando-se as figuras 4 e 5, verifica-se que existe uma correlação melhor entre os valores, obtidos pelo método proposto, e a concentração de biomassa das suspensões de *Citrobacter freundii*, do que a correlação entre as medidas de SSV e as respectivas concentrações de biomassa. Devido a esse fato, os resultados de SSV são ligeiramente inferiores do método colorimétrico conforme mostra a Figura 6.

A investigação da determinação de biomassa em amostras de cultura mista no reator estudado mostrou que o Método do Biureto pode ser aplicado, para essa avaliação, sob condições particulares. Os ensaios preliminares, referentes à determinação colorimétrica de biomassa dessas amostras, mostraram que uma única curva padrão não é suficiente para referenciar todas as dosagens, tendo sido necessário, neste trabalho, a utilização de duas curvas padrões, referentes a duas fases do reator. Adotando-se esse critério, obteve-se boa correlação entre as medidas

de biomassa pelo Biureto e pelos SSV, conforme mostra as Figuras 7 e 8.

Os resultados obtidos são informações preliminares que evidenciam a complexidade do assunto e sugerem pesquisas posteriores, abrindo novos horizontes ao tema.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — American Public Health Association. American Water Works Association. Water Pollution Control Federation — *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater* 16^a ed. Washington Public Association, 1985.
- 2 — Pirt, S. J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation* Beccles and London William Clowes Limited, 1985, 274p.
- 3 — Stickland, L. H. The Determination of Small Quantities of Bacteria by Means of biuret Reaction. *L. Gen Microbiol*, 5:698-703, 1951.