

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE AVES UTILIZANDO
SURFACTINA PRODUZIDA EM MANIPUEIRA**

NATÁSSIA JERSAK COSMANN

CASCAVEL – PARANÁ
FEVEREIRO DE 2015

NATÁSSIA JERSAK COSMANN

**TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE AVES UTILIZANDO
SURFACTINA PRODUZIDA EM MANIPUEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração em **Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental**.

Orientador: Dr. Benedito Martins Gomes
Coorientadora: Dr^a. Simone Damasceno Gomes
Coorientadora: Dr^a. Gláucia Maria Pastore

**CASCADEL – PARANÁ
FEVEREIRO DE 2015**

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO (CIP)

C868t

Cosmann, Natássia Jersak

Tratamento aneróbio de efluente de abatedouro de aves utilizando surfactina produzida em manipueira. Natássia Jersak Cosmann. Cascavel, 2015.

130 p.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Martins Gomes

Coorientadora: Profª. Drª. Simone Damasceno Gomes

Coordenadora: Profª. Drª. Gláucia Maria Pastore

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola

1. Biossurfactantes. 2. Gorduras em efluentes. 3. Resíduos agroindustriais. I. Gomes, Benedito Martins. II. Gomes, Simone Damasceno. III. Pastore, Gláucia Maria. IV. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. V. Título.

CDD 21.ed. 628.7466

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

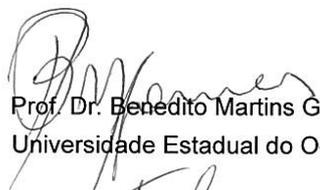
¹ Revisora de Língua portuguesa, inglesa e normas de monografias do PGEAGRI: Ana Maria Martins Alves Vasconcelos. Data das revisões: 12/05/2015.

NATÁSSIA JERSAK COSMANN

"Tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves com surfactina produzida em manipueira"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. Benedito Martins Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus Cascavel*



Prof. Dr. Ajadir Fazolo

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Londrina*



Prof.ª Dra. Juliana Bortoli Rodrigues Mees

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Medianeira*



Prof.ª Dra. Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus Cascavel*



Prof.ª Dra. Simone Damasceno Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus Cascavel*

Cascavel, 19 de fevereiro de 2015.

BIOGRAFIA RESUMIDA

Natássia Jersak Cosmann, nascida em 27 de agosto de 1985, na cidade de Seara-SC. Graduada em Ciências Biológicas – Bacharelado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), câmpus Cascavel (2007) e graduada em Ciências Biológicas – Licenciatura pela Faculdade Assis Gurgacz (2014). Mestre em Engenharia Agrícola – área de concentração: Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI) – UNIOESTE (2010). Especialista em Gestão Ambiental em Municípios pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), câmpus Medianeira (2011). Ingressou como aluna de doutorado do PGEAGRI em 2011, orientada pelo prof. Dr. Benedito Martins Gomes. Em 2014 foi aprovada como técnica administrativa em Educação do Instituto Federal do Paraná (IFPR), câmpus Cascavel. Em janeiro de 2015 foi aprovada como docente do Instituto Federal do Paraná (IFPR), câmpus de Assis Chateaubriand, onde atualmente está lotada e leciona nos cursos técnicos integrados ao ensino médio e no curso superior de Ciências Biológicas – modalidade Licenciatura.

“Saiu o semeador a semear. Semeou o dia todo, e a noite o apanhou ainda com as mãos cheias de sementes. Ele semeava tranquilo, sem pensar na colheita, porque muito tinha colhido dos outros que semearam”.

Cora Coralina

Para: Elisabete, Ênio, Ademir, Juliano e Rafaela.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Durante essa etapa da minha vida, muitas pessoas foram importantes tanto para o desenvolvimento da pesquisa quanto para formação da minha personalidade acadêmica.

Agradeço a UNIOESTE câmpus Cascavel, em especial ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), por me oportunizar a realização desta formação.

Ao meu orientador professor Dr. Benedito Martins Gomes e às minhas coorientadoras, professoras Dras. Simone Damasceno Gomes e Gláucia Maria Pastore pelo apoio e orientação do trabalho.

A todos os professores do PGEAGRI, em especial à Dra. Sílvia Machado Coelho, Dr. Divair Christ, Dr. Eloy Lemos de Mello, Dra. Luciane Sene e Dra. Mônica S. S. M. Costa.

Aos técnicos da UNIOESTE, Edison Barbosa da Cunha, Euro Kava Kailer e Fernando Leithardt pela amizade, auxílio, presteza e profissionalismo. Ao professor Vladimir P. Margarido (CCBS) pelo empréstimo do microscópio com câmera.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pela bolsa de estudos durante o período necessitado, e pelos recursos financeiros do projeto aprovado, respectivamente.

Às amigas e colegas de PGEAGRI Francieli Helena Bernardi, Carla Limberger Lopes, Tatiane Cristina Dal Bosco, Shaiane Dal'Maso Lucas, Larissa Kummer, Larissa Mallmann, Danielle Medina Rosa, Dércio Pereira, Denise Palma, Izabella Araújo, Isamara Godoi, Adriana Model, dentre todos os outros colegas de PGEAGRI.

Agradecimento especial aos acadêmicos de Ciências Biológicas, Oliver Pedroso e Ana Karolina pelo auxílio nas atividades laboratoriais, que atuaram como estagiários e companheiros nas jornadas de trabalho.

Ao Laboratório de Bioaromas e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, e à Ana Paula Resende Simiqueli, colega e amiga desta Instituição, pelo grandioso auxílio na obtenção do biossurfactante.

À Dra. Christiane Slivinski e à professora Dra. Nádia Krüger da UFPR-Curitiba pelo auxílio na caracterização da CMC do biossurfactante.

À empresa GLOBOAVES, em especial à Nikeli, pelo fornecimento do efluente utilizado na pesquisa.

Aos colegas do Instituto Federal do Paraná - campus de Cascavel pela compreensão, apoio e incentivo na realização do doutorado.

À minha família: meus pais Enio e Elisabete, meu marido Ademir, meus irmãos Juliano e Rafaela. Muito obrigada pelo suporte, amor, carinho, palavras e conversas que amenizaram a ansiedade.

TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE AVES UTILIZANDO SURFACTINA PRODUZIDA EM MANIPUEIRA

RESUMO

O efluente de agroindústrias abatedoras de aves apresenta elevada concentração de matéria orgânica, e, em razão disso, há a necessidade de realização de um tratamento antes de ser descartado no ambiente. Comumente promove-se um pré-tratamento físico-químico a fim de remover, principalmente, a gordura. Mais recentemente, a adição de metabólitos microbianos, que agem a fim de emulsionar ou quebrar as gorduras, é estudada como pré-tratamento alternativo. Os biossurfactantes são produtos do metabolismo de diversos microrganismos e possuem a capacidade de emulsionar e solubilizar uma solução composta por dois líquidos imiscíveis, e assim promover maior disponibilidade dos componentes presentes para a biodegradação. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves ao utilizar surfactina produzida em manipueira. O biossurfactante obtido foi caracterizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) como a surfactina em concentração de 30% no extrato bruto, com excelentes propriedades emulsificantes, estabilidade de emulsões de hidrocarbonetos e óleos vegetais e Concentração Micelar Crítica (CMC) de 28 mg.L⁻¹. Verificou-se também, de acordo com a metodologia de Atividade Metanogênica Específica (AME), que a surfactina não inibiu a comunidade microbiana presente no lodo a ser utilizado como inóculo na biodigestão anaeróbia, ao verificar que a produção de metano e redução da Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQOs) foi muito semelhante entre os tratamentos aplicados. O pré-tratamento do efluente de abatedouro de aves com a surfactina produzida foi realizado nas seguintes condições: 150 mL de volume útil, agitação de 150 rpm e tempo de incubação de até seis horas. Os efeitos das variáveis temperatura (25, 30, 42,5, 55 e 60°C), e da concentração de surfactina (6, 13,27, 31, 48,73 e 56 mg.L⁻¹) sobre o aumento da DQOs foram avaliadas pela metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Observou-se que o tempo de 4,5 horas foi suficiente para solubilizar a DQO em sua máxima concentração, e que nas maiores temperaturas e concentrações de surfactina (acima da CMC) encontraram-se os maiores valores de aumento da solubilização da DQO. O tratamento anaeróbio dos efluentes pré-tratados nas condições já mencionadas foi desenvolvido com as seguintes condições: 34°C, sem agitação, com eudiômetros para verificar a produção de metano e com amostras destrutivas para análise temporal dos parâmetros físico-químicos. A análise microbiológica do lodo anaeróbio foi realizada para caracterização inicial e final do inóculo entre os tratamentos a partir das metodologias de *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) e coloração de Gram. Foi possível observar que o efluente de abatedouro de aves é passível de biodigestão anaeróbia, com produção de metano no biogás. O volume acumulado de metano ao final do experimento para o tratamento controle, em que não houve a adição de surfactina no pré-tratamento, foi o menor observado entre os tratamentos. A remoção da DQOs apresentou-se igual entre os tratamentos aplicados assim como a remoção de Óleos e Graxas (OG), os quais podem ter sido disponibilizados com o efeito da temperatura sobre os constituintes do efluente ao invés de uma ação direta do biossurfactante na etapa de pré-tratamento. O acompanhamento dos ensaios, por meio das amostras destrutivas, permitiu observar o comportamento temporal dos parâmetros de controle diretamente envolvidos na biodigestão anaeróbia e constatar que o processo se desenvolveu adequadamente. A partir das análises microbiológicas foi possível observar que o biossurfactante surfactina não inibiu o aparecimento dos gêneros bacterianos comumente presentes em tratamentos anaeróbios de efluentes e apresentou, em todos os tratamentos, grande riqueza de espécies microbianas. De maneira geral, pode-se inferir que o biossurfactante surfactina não alterou significativamente quaisquer das propriedades do efluente de abatedouro de aves que permitissem melhorias na biodegradação anaeróbia e conseqüente maior produção de metano.

PALAVRAS-CHAVE: Biossurfactantes; gorduras em efluentes; resíduos agroindustriais.

ANAEROBIC TREATMENT OF POULTRY SLAUGHTERHOUSE WASTEWATER WITH SURFACTIN PRODUCED IN CASSAVA WASTEWATER

ABSTRACT

The effluent from poultry slaughterhouse has high concentration of organic matter, thus, it is essential to carry out a treatment before being disposed in the environment. A physico-chemical pretreatment is usually put forward mostly in order to remove fat. Recently, the addition of microbial metabolites, which act out to emulsify or break down fats, is studied as an alternative pre-treatment. The biosurfactants are metabolic products from several microorganisms and can solubilize and emulsify a solution composed of two immiscible liquids; thereby it promotes greater availability of components responsible for biodegradation. In this regard, this study aimed at evaluating the anaerobic treatment of effluent from poultry slaughterhouse when using surfactin produced in cassava. The obtained biosurfactant was characterized by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) as surfactin in 30% crude extract concentration, with excellent emulsifying properties, emulsion stability of hydrocarbons and green oils, so that Critical Micelle Concentration (CMC) was 28 mg. L⁻¹. It was also observed, according to the methodology of specific methanogenic activity (SMA), that surfactin did not inhibit microbial community present in sludge to be used as inoculum during the anaerobic biodigestion. It was also registered that methane production and reduction of Soluble Chemical Oxygen Demand (SCOD) was very similar among the applied treatments. Pretreatment of effluent from poultry slaughterhouse with the produced surfactin was carried out under the following conditions: 150 mL working volume, 150 rpm stirring and the incubation time of six hours. The effects of temperature variables (25, 30, 42.5, 55 and 60 ° C) and surfactin concentration (6, 13.27, 31, 48.73 and 56 mg.L⁻¹) on SCOD increase were evaluated by the method of delineation Central Composite Rotational (DCCR). It was observed that the 4.5-hour time was enough to solubilize COD at its maximum concentration and at higher temperatures and concentrations of surfactin (above CMC), the greatest values of increase were reached in COD solubility. The anaerobic treatment of pretreated effluents under the aforementioned conditions was developed based on the following conditions: 34 °C without stirring, with eudiometers to check methane production and with destructive samples for temporal analysis of physico-chemical parameters. Microbiological analysis of anaerobic sludge was carried out for initial and final inoculum characterization among treatments according to the methodologies of Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) and Gram stain. It was observed that effluent from poultry slaughterhouse can be submitted to anaerobic digestion, methane production in biogas. The cumulative volume of methane at the end of the trial for the control treatment, in which there was no surfactin addition in the pretreatment, was the lowest observed among the treatments. SCOD removal was the same among the studied treatments as well as the removal of oils and greases (GL), which may have been provided with the temperature effect on the effluent constituents rather than a direct action in phase of biosurfactant pretreatment. The assays monitoring through destructive samples allowed observing a temporal behavior of the control parameters directly involved in anaerobic digestion and note that the process developed properly. From the microbiological analyses, it was observed that the biosurfactant surfactin did not inhibit the emergence of bacterial genera commonly present in anaerobic wastewater treatment and presented in all treatments a great number of microbial species. In general, it can be inferred that the biosurfactant surfactin did not significantly change any of the poultry slaughterhouse effluent properties, which allow improvements in anaerobic biodegradation and consequent increased production of methane.

KEYWORDS: Biosurfactants; fats in effluents; agroindustrial wastes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x	
LISTA DE TABELAS.....	xii	
ESTRUTURA DA TESE – APRESENTAÇÃO GERAL.....	xiii	
CAPÍTULO 1 - Produção e caracterização de biossurfactante em manipueira e ensaio de atividade metanogênica específica do biossurfactante sobre lodo anaeróbio		1
RESUMO.....	1	
CHAPTER 1 – PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT IN CASSAVA WASTEWATER AND ASSAY OF SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY OF BIOSURFACTANT ON THE ANAEROBIC SLUDGE	1	
ABSTRACT	2	
1 INTRODUÇÃO.....	3	
1.2 OBJETIVOS.....	4	
1.2.1 Objetivo geral.....	4	
1.2.2 Objetivos específicos	4	
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5	
1.3.1 Características e propriedades dos surfactantes ou tensoativos	5	
1.3.2 Biossurfactantes	8	
1.3.3 Surfactina.....	10	
1.3.4 Produção de surfactina em manipueira	11	
1.3.5 Características da surfactina produzida em manipueira	13	
1.3.6 Capacidade de produção de metano por um consórcio microbiano	14	
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16	
1.4.1 Origem e produção do biossurfactante	16	
1.4.2 Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo	17	
1.4.3 Produção do biossurfactante.....	17	
1.4.4 Extração e semipurificação do biossurfactante	18	
1.4.5 Caracterização do biossurfactante	20	
1.4.5.1 Índice de emulsificação (IE%)	20	
1.4.5.2 Caracterização e quantificação do biossurfactante por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	20	
1.4.5.3 Determinação do poder tensoativo.....	21	
1.4.6 Origem, coleta e caracterização do lodo utilizado como inóculo no tratamento anaeróbio.....	22	
1.4.6.1 Atividade Metanogênica Específica do lodo anaeróbio	22	
1.4.7 Efeito inibitório do biossurfactante sobre o lodo anaeróbio	25	
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27	
1.5.1 Caracterização do biossurfactante obtido	27	
1.5.1.1 Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão	27	
1.5.1.2 Caracterização e quantificação do biossurfactante por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	28	
1.5.1.3 Atividade superficial do biossurfactante obtido.....	30	
1.5.2 Caracterização do lodo anaeróbio.....	31	
1.5.2.1 Avaliação da inibição do biossurfactante frente ao lodo anaeróbio	32	
1.6 CONCLUSÕES.....	34	
1.7 REFERÊNCIAS	35	
CAPÍTULO 2 – PRÉ-TRATAMENTO DE ELUENTE DE ABATEDOURO DE AVES COM SURFACTINA PRODUZIDA EM MANIPUEIRA.....		40
RESUMO.....	40	
CHAPTER 2 – PRETREATMENT OF POULTRY SLAUGHTERHOUSE WASTEWATER USING SURFACTIN PRODUCED IN CASSAVA WASTEWATER	41	

ABSTRACT	41
2.1 INTRODUÇÃO.....	42
2.2 OBJETIVOS.....	43
2.2.1 Objetivo geral.....	43
2.2.2 Objetivos específicos	43
2.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	44
2.3.1 Características do efluente de abatedouro de aves	44
2.3.2 Aplicação de metabólitos microbianos no pré-tratamento de efluentes com elevados teores de lipídeos	48
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.4.1 Origem, coleta e caracterização do efluente de abatedouro de aves	50
2.4.2 Pré-tratamento do efluente com o biossurfactante surfactina.....	51
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
2.5.1 Caracterização do efluente de abatedouro de aves	53
2.5.2 Pré-tratamento do efluente com surfactina.....	55
2.6 CONCLUSÕES.....	61
2.7 REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO 3 – TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE AVES PRÉ-TRATADO COM BIOSURFACTANTE	66
RESUMO.....	66
CHAPTER 3 – ANAEROBIC TREATMENT OF POULTRY SLAUGHTERHOUSE PRETREATED WITH BIOSURFACTANT.....	67
ABSTRACT	67
3.1 INTRODUÇÃO.....	68
3.2 OBJETIVOS.....	69
3.2.1 Objetivo geral.....	69
3.2.2 Objetivos específicos	69
3.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	70
3.3.1 Biodigestão anaeróbia de efluentes	70
3.3.2 Efeito da presença de gordura ou lipídeos no tratamento biológico anaeróbio.....	72
3.3.2 Aplicação de biossurfactantes no tratamento de efluentes.....	74
3.3.3. Análises microbiológicas para o monitoramento de lodos anaeróbios.....	75
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3.4.1 Tratamento anaeróbio do efluente pré-tratado com surfactina	78
3.4.2 Avaliação microbiológica do lodo anaeróbio	83
3.4.2.1 Hibridização <i>In Situ</i> com Sondas Fluorescentes.....	83
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.5.1 Monitoramento do tratamento anaeróbio.....	86
3.5.1.1 pH.....	86
3.5.2 Análises microbiológicas.....	99
3.5.2.1 Hibridização <i>In Situ</i> com Sondas Fluorescentes (FISH)	100
3.5.2.2 Coloração de Gram.....	104
3.6 CONCLUSÕES.....	107
3.7 REFERÊNCIAS	108
CONCLUSÕES GERAIS	113
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma das etapas executadas durante o desenvolvimento da tese.....	xiv
Figura 2 Representação esquemática de uma molécula de surfactante.	5
Figura 3 Representação esquemática da adsorção e orientação das moléculas nas interfaces.....	6
Figura 4 Processo de formação da micela.....	6
Figura 5 Esquema gráfico que demonstra a tensão superficial em função da concentração do surfactante.....	7
Figura 6 Estrutura do lipopetídeo cíclico surfactina, produzido por <i>Bacillus subtilis</i>	10
Figura 7 Biorreator utilizado para cultivo do microrganismo em manipueira e produção do biossurfactante.	17
Figura 8 Etapas de cultivo do <i>Bacillus subtilis</i> LB5a e obtenção do biossurfactante surfactina.	18
Figura 9 Fluxograma de extração e semipurificação do biossurfactante.	19
Figura 10 Extrato em pó do biossurfactante obtido no cultivo de <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.....	19
Figura 11 Tensiômetro utilizado para determinação da tensão superficial e da DMC.	21
Figura 12 Lodo anaeróbio aderido ao suporte.....	22
Figura 13 Aparato experimental utilizado no teste de atividade metanogênica específica: (1) reator; (2) gasômetro; (3) frasco de coleta do NaOH.	25
Figura 14 Tubos com os hidrocarbonetos e óleos vegetais emulsionados com o biossurfactante. Em ordem: (1) Diesel, (2) óleo de soja, (3) gasolina e (4) óleo de girassol.	28
Figura 15 Perfis de eluição das diferentes concentrações de surfactina padrão (Sigma-aldrich) obtidos por CLAE.	28
Figura 16 Perfil de eluição do biossurfactante surfactina de <i>B. subtilis</i> LB5a obtido por CLAE.	29
Figura 17 Curva obtida para a diminuição da tensão superficial da água destilada em função da adição de surfactina.....	31
Figura 18 Produção cumulativa de metano durante o período de desenvolvimento do teste da AME.....	32
Figura 19 Fluxograma do processamento de aves em um abatedouro.....	45
Figura 20 Local de coleta do efluente de abatedouro de aves.	50
Figura 21 Aumento da DQO solúvel no decorrer do tempo, para as diferentes condições aplicadas nos ensaios.....	56
Figura 22 Efeitos padronizados e estimados para o aumento da DQO solúvel em 4,5 horas, com a concentração de biossurfactante e temperatura como variáveis independentes.	57
Figura 23 Superfície de resposta para o aumento de DQO _s em função da temperatura e concentração de biossurfactante.	58
Figura 24 Gráficos de desejabilidade para os fatores concentração de biossurfactante e temperatura.	59
Figura 25 Degradação anaeróbia de gorduras.....	73
Figura 26 Modelo esquemático de uma unidade experimental utilizada no tratamento anaeróbio do efluente.	79
Figura 27 Aparato experimental completo utilizado no tratamento anaeróbio do efluente.	80
Figura 28 Vista superior da disposição dos reatores anaeróbios na caixa de banho-maria.	80
Figura 29 Composições dos efluentes pré-tratados aplicados na etapa de tratamento anaeróbio.....	81
Figura 30 Reatores armazenados em câmara BOD: Réplicas destrutivas dos tratamentos anaeróbios desenvolvidos nos eudiômetros.	82
Figura 31 Procedimentos realizados na técnica de FISH: fixação, hibridação, lavagem e detecção.....	85
Figura 32 Comportamento do parâmetro alcalinidade total no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.	87

Figura 33 Comportamento do parâmetro acidez volátil no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.	88
Figura 34 Relação acidez volátil/alcalinidade total no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.	89
Figura 35 Produção cumulativa de metano obtida pela média de cada um dos tratamentos no decorrer do período de biodigestão anaeróbia.	95
Figura 36 Atividade metanogênica específica obtida pela média de cada um dos tratamentos no decorrer do período de biodigestão anaeróbia.	96
Figura 37 Comportamento do ácido acético no decorrer das cinco semanas de biodigestão anaeróbia dentre os tratamentos aplicados.	97
Figura 38 Comportamento do ácido propiônico no decorrer das cinco semanas de biodigestão anaeróbia dentre os tratamentos aplicados.	98
Figura 39 Comportamento do ácido butírico no decorrer das cinco semanas de biodigestão anaeróbia dentre os tratamentos aplicados.	99
Figura 40 Morfologia de microrganismos sob epifluorescência observados em corante DAPI (azul) e com a sonda EUB338 (vermelho) para as amostras: (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.	100
Figura 41 Morfologia de microrganismos sob epifluorescência observados em corante DAPI (azul) e com a sonda ARC915 (vermelho) para as amostras: (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.	102
Figura 42 Morfologia de microrganismos observados em coloração de Gram. (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização da manipueira segundo diversos autores.....	11
Tabela 2 Caracterização da manipueira utilizada como meio de cultura para a obtenção do biossurfactante.....	16
Tabela 3 Composição das soluções estoque de nutrientes.....	23
Tabela 4 Composição da solução estoque de ácidos orgânicos.....	23
Tabela 5 Tratamentos aplicados nos ensaios de inibição da surfactina sobre o lodo anaeróbio.....	26
Tabela 6 Índices de emulsificação do biossurfactante surfactina e do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS).....	27
Tabela 7 Caracterização físico-química do biossurfactante surfactina produzido por <i>Bacillus subtilis</i> LB5a em manipueira e utilizado neste trabalho.....	31
Tabela 8 Caracterização do lodo anaeróbio a ser utilizado como inóculo nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.....	32
Tabela 9 Resultados do ensaio de biodegradabilidade anaeróbia do lodo com adição de diferentes concentrações de surfactina produzida por <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.....	33
Tabela 10 Caracterização do efluente bruto de abatedouro de aves segundo diversos autores.....	45
Tabela 11 Condições de lançamentos de efluentes de acordo com a Resolução nº 430/2011 do CONAMA.....	47
Tabela 12 Parâmetros e metodologias de análise para caracterização do efluente bruto de abatedouro de aves.....	50
Tabela 13 Valores reais e codificados das variáveis: concentração de biossurfactante (BS) e temperatura (T).....	52
Tabela 14 Parâmetros de caracterização e resultados médios obtidos.....	53
Tabela 15 Matriz codificada e valores de DQO solúvel nos tempos avaliados, em resposta à temperatura e concentração de biossurfactante.....	55
Tabela 16 Análise de variância para o planejamento do DCCR em 4,5 horas, que utiliza a concentração de biossurfactante e temperatura como variáveis independentes.....	58
Tabela 17 Caracterização do efluente de abatedouro de aves e do lodo utilizados no tratamento anaeróbio.....	78
Tabela 18 Parâmetros, periodicidade, local de coleta, métodos e metodologias empregados na avaliação do tratamento anaeróbio.....	82
Tabela 19 Sequências das sondas filogenéticas utilizadas.....	84
Tabela 20 Valores de pH observados durante a biodigestão anaeróbia nas amostras destrutivas e nos eudiômetros.....	86
Tabela 21 Concentrações e porcentagem de remoção de DQOs para as amostras destrutivas e dos eudiômetros no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia.....	90
Tabela 22 Análise de variância dos valores médios de DQOs apresentados pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.....	91
Tabela 23 Teste de Tukey para comparação das médias de DQOs apresentadas pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.....	92
Tabela 24 Concentrações e porcentagem de remoção de OG para as amostras destrutivas e dos eudiômetros no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia.....	93
Tabela 25 Análise de variância dos máximos valores de AME apresentados pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.....	96

ESTRUTURA DA TESE – APRESENTAÇÃO GERAL

Esta tese está dividida em três capítulos. No primeiro capítulo está apresentado e desenvolvido o tema sobre a produção do biossurfactante a ser utilizado para alcançar os resultados nos demais capítulos. A partir de uma parceria técnica com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), especificamente com o Laboratório de Bioaromas, foi produzido o biossurfactante. Para isso, utilizou-se da cepa de *Bacillus subtilis* LB5a e do resíduo agroindustrial de produção de mandioca (manipueira) como meio de cultivo. Realizou-se o cultivo em biorreator em escala piloto, nas condições que já eram estudadas e publicadas pelos pesquisadores da UNICAMP. Apresentam-se, dessa forma, a caracterização do biossurfactante obtido bem como a avaliação da inibição dos microrganismos anaeróbios conversores da matéria orgânica e geradores de biogás. Isso impediria, conseqüentemente, sua aplicação na área de tratamento de efluentes (objetivo final desta tese). Para alcançar tal resposta, utilizou-se a metodologia da Atividade Metanogênica Específica (AME).

O segundo capítulo enfoca a etapa de pré-tratamento de efluentes que apresentam gorduras em sua constituição, visto que essas podem ocasionar diversos problemas operacionais aos sistemas de tratamento de efluentes biológicos. Nesse sentido, o biossurfactante surfactina produzido, foi avaliado quanto à sua capacidade de solubilizar a matéria orgânica e degradação presente no efluente de abatedouro de aves, como a que constitui os óleos e graxas (OG). Em ensaios de incubação do efluente, foi observada a influência das concentrações de surfactina e das diferentes temperaturas ao atuar sobre a variável resposta.

No terceiro capítulo apresenta-se a etapa final do tratamento biológico do efluente de abatedouro de aves por biodigestão anaeróbia. Com o efluente pré-tratado na condição ideal, esse é submetido à biodigestão anaeróbia para avaliação da remoção da sua carga orgânica e produção de metano. Nesta etapa foram utilizados eudiômetros para mensurar volumetricamente a produção de metano, e por não serem compatíveis sua abertura e retirada de amostra com a biodigestão, foram desenvolvidas amostras destrutivas em garrafas de 500 mL. Dessa maneira foi possível analisar temporalmente a degradação da matéria orgânica e a variação dos demais parâmetros físico-químicos, tais como: pH, alcalinidade, acidez, série de sólidos, Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQOs), ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, butírico e láctico) e concentração de OG. Também foi avaliada a comunidade microbiana do lodo anaeróbio, por meio das técnicas de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) e coloração de Gram.

Na Figura 1 é apresentado o fluxograma das etapas realizadas para o desenvolvimento da tese.

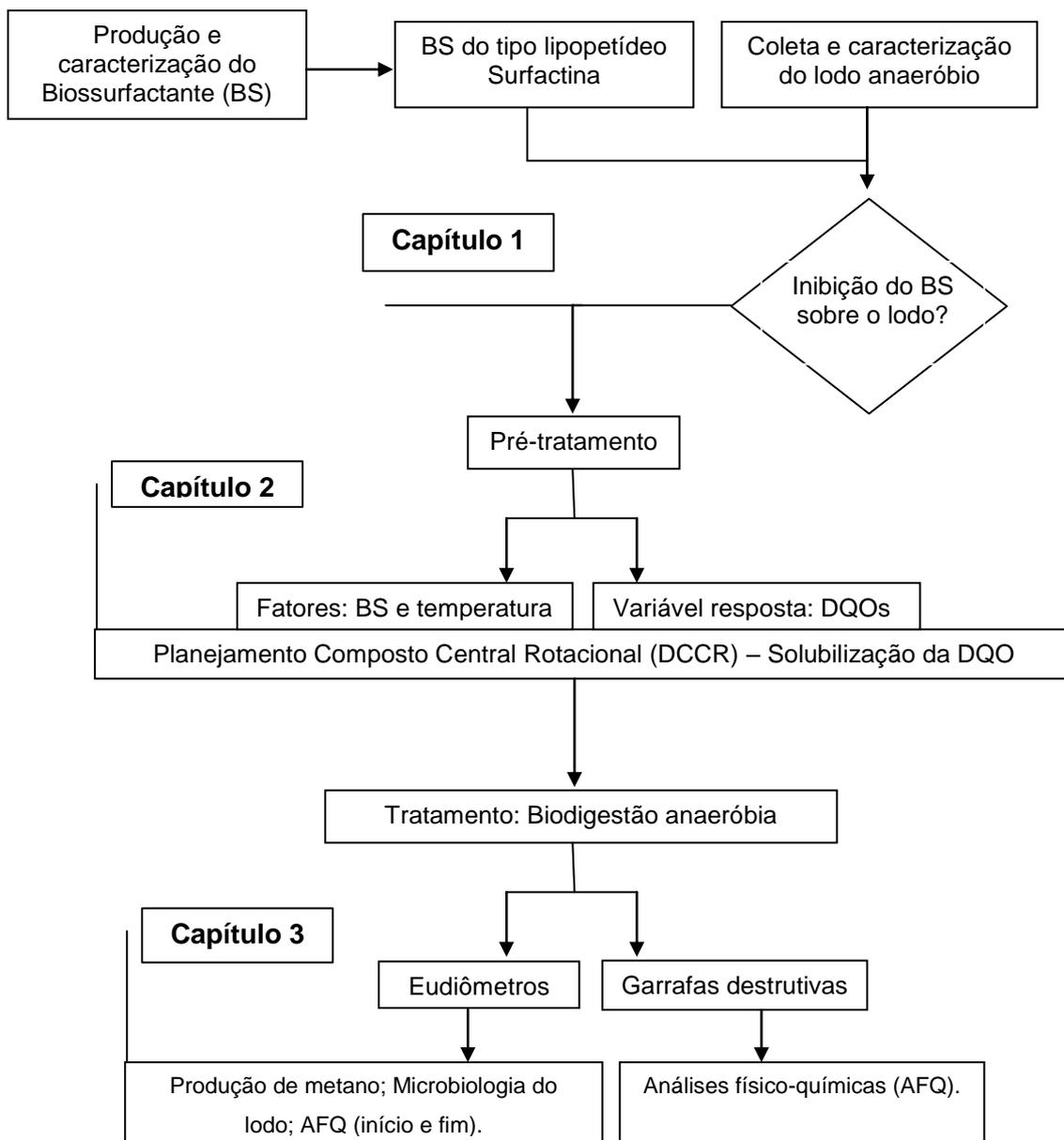


Figura 1 Fluxograma das etapas executadas durante o desenvolvimento da tese.

CAPÍTULO 1 - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE EM MANIPUEIRA E ENSAIO DE ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA DO BIOSURFACTANTE SOBRE LODO ANAERÓBIO

RESUMO

O efluente proveniente da agroindústria processadora de mandioca (manipueira) apresenta características que podem ser exploradas em pesquisas biotecnológicas. A manipueira pode ser utilizada como meio de cultura para o crescimento de linhagens bacterianas que, metabolicamente, produzem substâncias como os biosurfactantes. A produção de biosurfactantes a partir de resíduos agroindustriais pode representar uma alternativa viável nos aspectos econômicos e funcionais, pois, no Brasil, há diversas agroindústrias geradoras de elevados volumes de efluentes. Os biosurfactantes possuem a capacidade de reduzir a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis, assim, os torna passíveis de aplicação em muitas áreas. Na área ambiental, podem ser aplicados no tratamento de efluentes que apresentam óleos e graxas na composição. Os objetivos desta pesquisa foram caracterizar o biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LB5a, em manipueira e avaliar a aplicação desse frente ao consórcio microbiano presente no lodo anaeróbio utilizado no tratamento do efluente. O processo de obtenção, semi-purificação e caracterização do biosurfactante foi descrito, e observou-se, ao utilizar-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que se trata da surfactina em concentração de 30% no extrato bruto. Observou-se também que a surfactina apresentou propriedades emulsificantes e estabilidade de emulsão após 72 horas de avaliação de acordo com a metodologia do índice de emulsificação aplicada em hidrocarbonetos e óleos vegetais. A Concentração Micelar Crítica (CMC), obtida com um tensiômetro, foi em torno de 28 mg.L^{-1} , o que caracterizou excelente CMC. Desenvolveu-se o teste da Atividade Metanogênica Específica (AME) para avaliar a inibição da surfactina no lodo anaeróbio e observar a produção de biogás bem como a redução da matéria orgânica (Demanda Química de Oxigênio solúvel). Foram aplicadas as seguintes concentrações de surfactina: na CMC (28 mg.L^{-1}), cinco vezes abaixo da CMC ($5,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e cinco vezes acima da CMC (140 mg.L^{-1}). Observou-se que a surfactina, em todas as suas concentrações testadas, não inibiu a comunidade microbiana presente no lodo anaeróbio, e com isso conclui-se que este biosurfactante pode ser aplicado na área de tratamento de efluentes.

Palavras-chave: Surfactina, *Bacillus subtilis*, efluentes agroindustriais, lodo anaeróbio.

CHAPTER 1 – PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT IN CASSAVA WASTEWATER AND ASSAY OF SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY OF BIOSURFACTANT ON ANAEROBIC SLUDGE

ABSTRACT

The effluent from cassava agribusiness (cassava) processing has some characteristics that can be used on biotechnology research. Cassava may be used as culture medium to grow bacterial strains that produce metabolically substances such as biosurfactants. The biosurfactants production from agroindustrial waste can be a viable alternative in economic and functional aspects, since there are several agro-industries that have generated high volumes of effluents in Brazil. Biosurfactants can reduce interfacial tension between two immiscible liquids, which makes them believable to be applied in many areas. In the environmental area, they can be applied in wastewater treatment that have oil and grease in their composition. Thus, this trial aimed at characterizing a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LB5a in cassava, and evaluate its application based on the microbial consortium present in anaerobic sludge used to treat such effluent. The process of obtaining, semi-purification and biosurfactant characterization has been described during this trial and it was observed when using the high-performance liquid chromatography (HPLC) that it was the 30% surfactin concentration in crude extract. It was recorded that surfactin has emulsifying properties and showed some emulsion stability after 72-evaluation hours according to the emulsifying index methodology applied in hydrocarbons and green oils. The critical micelle concentration (CMC), obtained by a tensiometer, was near 28 mg l⁻¹, featured as excellent CMC. The specific methanogenic activity test (SMA) was developed to evaluate surfactin inhibition in anaerobic sludge, record biogas production and organic matter reduction (Soluble Chemical Oxygen Demand). The following surfactin concentrations have been applied: CMC (28 mg l⁻¹), five times below the CMC (5.6 mg l⁻¹) and five times the CMC (140 mg.L⁻¹). It was observed that surfactin, in all its tested concentrations, did not inhibit microbial community present in anaerobic sludge. At last, it is concluded that this biosurfactant can be applied in waste treatment area.

KEYWORDS: Surfactin, *Bacillus subtilis*, agroindustrial effluents, anaerobic sludge.

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são produtos que atuam na redução da tensão superficial entre dois líquidos não miscíveis (por exemplo: água e óleo) e, por isso, são úteis e empregados em muitas áreas, tais como: farmacêutica, cosmética, médica, recuperação de petróleo, produtos de limpeza, biorremediação de áreas contaminadas, dentre outras.

Os surfactantes podem ser produzidos quimicamente ou biologicamente (biossurfactantes). A maioria é produzida a partir de derivados de petróleo, mas os biossurfactantes são obtidos do metabolismo de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras.

Atualmente, há muito interesse na produção de biossurfactantes, pois esses apresentam algumas vantagens frente aos surfactantes de origem química: baixa toxicidade, biodegradabilidade, menor custo de produção e suportam condições adversas (de pH, temperatura e pressão), o que mantém suas propriedades funcionais.

A obtenção de biossurfactantes, que utiliza resíduos agroindustriais como meio de cultura ao microrganismo produtor, é uma área que, nos últimos tempos, tornou-se alvo de pesquisa. As agroindústrias processadoras de matérias naturais geram efluentes com carga orgânica que pode ser aproveitada como substrato ao crescimento microbiano, como é o caso do efluente da indústria de processamento de mandioca, a manipueira.

A aplicação dos biossurfactantes nas mais diversas áreas é investigada bem como na área ambiental. No tratamento de efluentes gordurosos, os biossurfactantes podem emulsionar, e assim disponibilizar a matéria orgânica presente nas grandes moléculas de gordura aos microrganismos, o que acelera a degradação microbiana do resíduo.

No Brasil, o processo biológico de tratamento de efluentes agroindustriais é muito utilizado devido às condições climáticas e de extensão territorial. O tratamento anaeróbio acontece na ausência de oxigênio, onde os microrganismos presentes, principalmente no lodo, degradam a matéria orgânica, reduzem a carga poluente e produzem biogás.

O sucesso de um processo anaeróbio de tratamento depende fundamentalmente da manutenção de uma biomassa com elevada atividade microbiológica no lodo. Nesse sentido, os biossurfactantes podem ser explorados para serem utilizados como complementares no tratamento biológico, e, dessa forma, é necessário que seja avaliada sua aplicação e efeito na microbiota do lodo anaeróbio.

Assim, este capítulo apresenta a caracterização do biossurfactante, obtido a partir do cultivo de uma linhagem bacteriana em manipueira bem como a investigação do seu potencial de inibir o crescimento dos microrganismos presentes no lodo anaeróbio a ser utilizado no tratamento de efluente por biodigestão anaeróbia.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar o biossurfactante obtido em manipueira, e avaliar sua inibição aos microrganismos presentes em um lodo anaeróbio.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o biossurfactante obtido no cultivo de *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira quanto aos parâmetros: índice de emulsificação, redução da tensão superficial, concentração micelar crítica, classificação e concentração;
- Caracterizar o lodo proveniente de biodigestor a ser utilizado como inóculo na etapa de tratamento anaeróbio do efluente de abatedouro de aves quanto a sua capacidade de produzir metano no biogás;
- Desenvolver o ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) para avaliar a inibição dos microrganismos presentes no lodo anaeróbio frente ao biossurfactante obtido.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Características e propriedades dos surfactantes ou tenso-ativos

O termo surfactante descreve um composto de molécula anfipática ou anfífilica, com uma cabeça hidrofílica (polar) e uma cauda hidrofóbica (apolar), que possui a capacidade de reduzir a tensão superficial no meio (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999). Na Figura 2 pode-se observar a representação esquemática de uma molécula de surfactante.

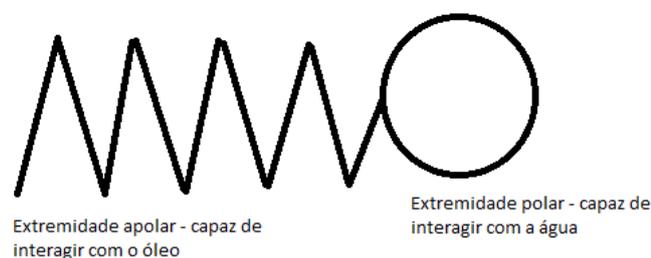


Figura 2 Representação esquemática de uma molécula de surfactante.

A classificação dos surfactantes ou tenso-ativos depende da existência ou não de carga em sua extremidade polar: quando a extremidade polar apresenta carga negativa, este tipo de surfactante é chamado de aniônico; se for positiva, é catiônico. Os que não apresentam cargas verdadeiras são os não-iônicos; e os surfactantes anfóteros, são aqueles que se comportam como aniônicos ou catiônicos, o que depende do pH da solução (DALTIM, 2011).

Em função da estrutura da molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo), o que dá origem a um filme molecular, ordenado nas interfaces, que é responsável pelas propriedades únicas destes compostos (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A estabilidade desse filme depende da natureza dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (ROSSI et al., 2006).

Daltin (2011) explica que quando uma molécula tensoativa é solubilizada em água, a parte polar (hidrofílica) da molécula auxilia na sua solubilização, enquanto a parte apolar (hidrofóbica) diminui sua solubilidade. A solução é estável caso a extremidade hidrofílica seja suficientemente polar para solubilizar a parte apolar. Da mesma maneira, a molécula, quando solubilizada em um óleo, tem a parte hidrofóbica responsável pela sua solubilidade (Figura 3). Um surfactante, por apresentar as características hidrofílicas e hidrofóbicas na mesma molécula, nunca apresenta total estabilidade na sua dissolução, e é essa instabilidade que proporciona as características diferenciadas aos surfactantes.

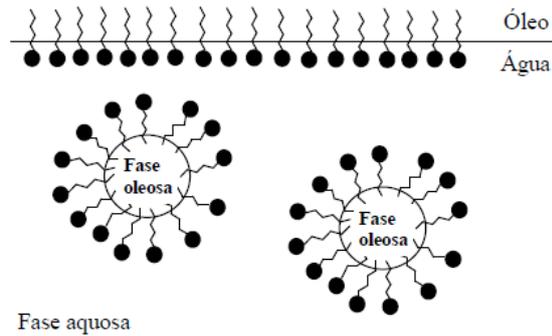


Figura 3 Representação esquemática da adsorção e orientação das moléculas nas interfaces.

Fonte: Rossi et al. (2006).

Em soluções diluídas, as moléculas dos surfactantes apresentam-se dispersas, enquanto que em soluções mais concentradas organizam-se em agregados moleculares, que geralmente contêm de 50 a 100 moléculas, denominadas micelas (RIZZATI; ZANETTE, 2009), em um processo conhecido como micelização. Os agregados crescem e se organizam, pois são mais estáveis que os surfactantes livres em solução (DALTIM, 2011).

Para cada tipo de surfactante existe uma concentração na qual todas as superfícies (óleo-água, líquido-ar e líquido-sólido) já estão ocupadas pelas moléculas, e a quantidade de surfactante excedente atinge uma concentração mínima necessária para o início de formação de micelas (Figura 4). Essa concentração é uma característica físico-química do surfactante e é chamada de concentração micelar crítica (CMC) (DALTIM, 2011).

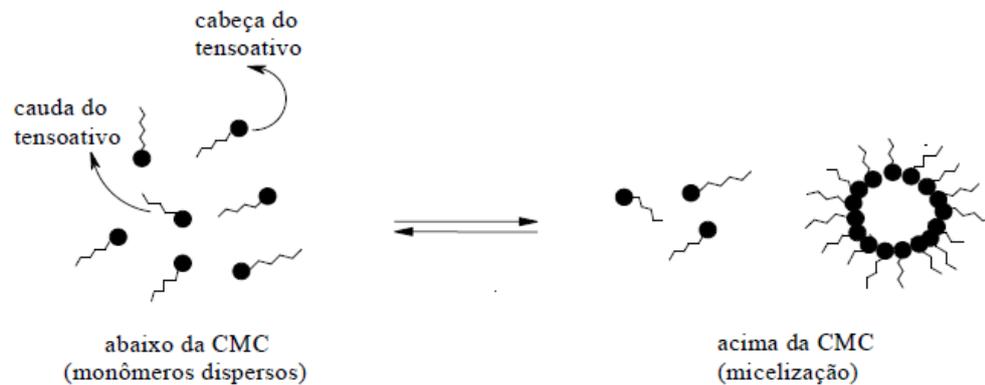


Figura 4 Processo de formação da micela.

Fonte: Rossi et al. (2006).

A CMC é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica. As micelas são responsáveis pela catálise micelar e pela solubilização de gorduras (RIZZATI; ZANETTE, 2009).

Devido à presença do surfactante, menos trabalho é necessário para trazer uma molécula à superfície e a tensão superficial é reduzida. Por exemplo, um bom surfactante pode reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A tensão superficial correlaciona-se com a concentração do composto superfície-ativo até que a CMC seja

alcançada. Os surfactantes eficientes apresentam uma baixa CMC, pois, assim, menos surfactante é necessário para reduzir a tensão superficial. Na prática, a CMC é também a concentração máxima de monômeros de surfactante na água, e é influenciada pelo pH, temperatura e força iônica (MULLIGAN, 2005).

O gráfico da tensão superficial em função de log da concentração do surfactante comporta-se como apresentado na Figura 5.

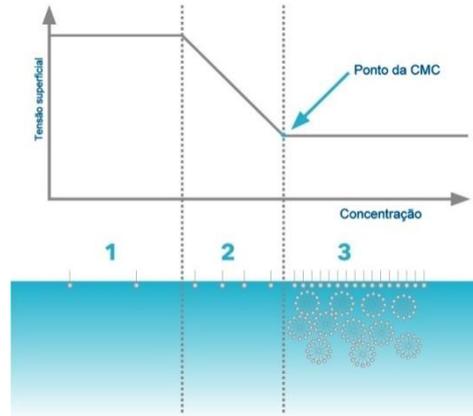


Figura 5 Esquema gráfico que demonstra a tensão superficial em função da concentração do surfactante.

Fonte: Adaptado de Attension (2012).

No gráfico supra é possível observar três fases: em 1) com concentrações muito baixas de surfactante no meio, ligeira alteração na tensão superficial é detectada; em 2) a adição de surfactante diminui a tensão superficial; em 3) a superfície do líquido torna-se completamente carregada de surfactante, assim, não ocorre nenhuma mudança adicional da tensão superficial. A CMC é encontrada como o ponto em que duas linhas se intersectam; a linha de base da tensão superficial mínima, e a linha em que a inclinação da tensão superficial mostra declínio linear (ATTENSION, 2012).

A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, além de ser responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Tais propriedades tornam os surfactantes adequados para um grande número de aplicações industriais (SINGH et al., 2007).

A biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos tais como gorduras, pode ser aumentada por surfactantes através dos seguintes mecanismos: emulsificação, aumento da solubilidade aparente dos compostos, facilidade no transporte de substâncias da fase sólida e auxílio aos microrganismos na adsorção às partículas (BUSTAMANTE et al., 2012).

1.3.2 Biossurfactantes

Muitas moléculas biológicas são anfífilas e localizam-se preferencialmente nas interfaces. Os compostos microbianos que exibem alta atividade superficial e emulsificante são classificados como biossurfactantes ou biotenso-ativos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Os biossurfactantes são produtos de origem biotecnológica de grande importância que apresentam três funções principais: aumentam a área superficial de substratos hidrofóbicos insolúveis em água, aumentam a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos pelo aumento de sua solubilidade aparente e influenciam a adesão de microrganismos à superfícies (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004), assim promovem conseqüentemente maior degradação microbiana do substrato (SANTOS; MILLIOLI, 2003).

Uma grande variedade de microrganismos possui a capacidade de produzir biossurfactantes, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica*, *Acinetobacter radioresistensis*, *Serratia sp.*, dentre outros (DESAI; BANAT, 1997).

Existem muitas moléculas complexas incluídas nos biossurfactantes, como os glicolipídios, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e particulados. Tais surfactantes naturais são classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana, além de estarem os microrganismos produtores distribuídos em diversos gêneros, em sua maioria bactérias (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Na emulsificação, os biossurfactantes podem diminuir a tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase não aquosa. Isto pode orientar a formação de micro e macro emulsões, que resulta no aumento da área de contato entre o microrganismo e o substrato. O aumento da solubilidade aparente de compostos orgânicos hidrofóbicos é devido à presença de micelas que contêm altas concentrações desses compostos em seu interior (BUSTAMANTE et al., 2012).

Os surfactantes produzidos por microrganismos devem competir com os surfactantes de origem petroquímica em três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção, a fim de suprir as necessidades de aplicação. Enquanto os elevados custos de produção podem ser tolerados para os surfactantes usados em pequenos volumes, como na produção de cosméticos e medicamentos, o valor elevado na produção é incompatível para a aplicação em outras áreas, como na recuperação avançada de óleo (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999) e no tratamento de efluentes.

As vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos incluem a biodegradabilidade (Lima et al., 2011), baixa toxicidade (Islas et al., 2010) bem como a manutenção da funcionalidade e estrutura sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; NITSCHKE; PASTORE, 2006; BARROS et al. 2008a).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. O interesse biotecnológico nos surfactantes produzidos por outros meios, como por microrganismos, reside no fato de que existe uma tendência de substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Tal propensão é movida pela necessidade de produtos mais brandos devido à preocupação ambiental entre os consumidores, pela necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis, combinada com novas legislações ambientais, e pelo aumento da especificidade dos produtos (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de microrganismos em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras, ou uma mistura desses, o que inviabiliza a produção em larga escala devido aos custos dos substratos (KRONEMBERGER et al., 2008).

Uma das possibilidades para diminuir o custo da produção de biossurfactantes é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para o crescimento dos microrganismos produtores de tais compostos. A utilização de resíduos para a produção de biossurfactantes pode reduzir potencialmente os custos de produção a níveis competitivos com o produto similar derivado de petróleo, e, ao mesmo tempo, promover economia no tratamento dos resíduos. Os carboidratos e os óleos vegetais estão entre os resíduos mais utilizados como substratos (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999).

Há relatos da produção de biossurfactantes a partir de resíduos de vários processos agroindustriais, tais como efluentes do processamento de oliva, da produção de óleo vegetal, do processamento da batata, do processamento de raízes de mandioca (Makkar; Cameotra; Banat, 2011) e de bagaço de cana e okara (resíduo do preparo de leite de soja) (SLIVINSKI, 2012).

Sobrinho (2007) avaliou a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*, e utilizou dois resíduos industriais: milhocina (resíduo resultante da maceração do milho) e resíduo de refinaria de óleo de soja como meios nutrientes. O biossurfactante obtido foi caracterizado como glicolípido e apresentou características desejáveis, tais como: redução da tensão superficial, índice de emulsificação e manutenção das propriedades frente a pH e temperaturas adversas, baixa CMC e potencial de aplicação na área de biorremediação ambiental.

No Brasil, diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de utilizar os resíduos agroindustriais como substrato, dentre os quais se destaca o resíduo líquido proveniente do processamento da mandioca, chamado de manipueira. Esse efluente é gerado em grandes quantidades na indústria (300 L.t⁻¹ de raiz processada para a obtenção de farinha). Todavia, a disposição do mesmo no ambiente pode gerar diversos problemas devido à alta carga orgânica constituinte. Por outro lado, tal resíduo é composto de carboidratos, nitrogênio,

1.3.4 Produção de surfactina em manipueira

No processamento da mandioca são gerados resíduos, e dentre os principais está a manipueira, que consiste em um resíduo líquido de aspecto leitoso que escorre das raízes da mandioca por ocasião da sua moagem e prensagem. Na forma física, é uma suspensão aquosa, e quimicamente apresenta-se como uma mistura de amido, glicose e outros açúcares, proteínas, linamarina e derivados cianogênicos, substâncias orgânicas diversas e sais minerais (FARIAS; FERREIRA FILHO; MATTOS, 2006).

A disposição desse resíduo causa problema ambiental devido à alta carga orgânica bem como devido à toxidez decorrente do glicosídeo linamarina, presente em todas as partes da planta e que, por hidrólise, origina a glicose, a acetona e o ácido cianídrico. A linamarina é muito solúvel em água. Há relatos da morte de animais que beberam a manipueira e dados de elevada poluição de rios que atravessam comunidades produtoras de farinha de mandioca (CARVALHO et al., 2005; CRUZ, 2009).

Entretanto, a manipueira tem se mostrado como um potencial substrato a ser utilizado em processos biotecnológicos, como na produção de biossurfactantes (Nitschke; Pastore, 2003), não apenas por promover o crescimento bacteriano e acúmulo do produto, mas também por permitir a obtenção de um biossurfactante com propriedades interessantes e úteis, com potencial para muitas aplicações industriais (NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Makkar; Cameotra e Banat (2011) destacam que os resíduos ricos em amido podem ser utilizados como substrato para a produção de biossurfactantes devido ao seu conteúdo nutricional, como a presença de carboidratos, íons metálicos, nitrogênio e outros, que tornam desnecessária a suplementação nutricional.

Na Tabela 1 é apresentada a caracterização da manipueira segundo diversos autores.

Tabela 1 Caracterização da manipueira segundo diversos autores.

Parâmetro	Autores			
	Nitschke; Pastore (2003)	Nitschke; Pastore (2006)	Barros (2007)	Costa (2010)
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg.L ⁻¹)	-	55800	-	-
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) (mg.L ⁻¹)	2100	2500	1920	-
Fósforo (mg.L ⁻¹)	244	225	246	900
Potássio (mg.L ⁻¹)	3472	2665	894	3960
Enxofre (mg.L ⁻¹)	154	104	150	-
Cálcio (mg.L ⁻¹)	292	272	212	-
Magnésio (mg.L ⁻¹)	519	519	288	550
Ferro (mg.L ⁻¹)	7,8	7,8	4,2	6
Zinco (mg.L ⁻¹)	2,8	7,3	1,4	11
Manganês (mg.L ⁻¹)	1,7	1,8	1,6	4
Cobre (mg.L ⁻¹)	1	0,6	0,3	14

Tabela 1 (continuação) Caracterização da manipueira segundo diversos autores.

Parâmetro	Autores			
	Nitschke; Pastore (2003)	Nitschke; Pastore (2006)	Barros (2007)	Costa (2010)
Carboidratos totais (mg.L ⁻¹)	41500	35300	-	-
Açúcares redutores (mg.L ⁻¹)	18200	12800	13900	-
Açúcares não redutores (mg.L ⁻¹)	23200	22200	-	-
Nitrato (mg.L ⁻¹)	-	-	16,2	710
Nitrito (mg.L ⁻¹)	-	-	-	0,05
Sólidos totais (ST) (mg.L ⁻¹)	62000	-	-	-
Proteína (%)	-	-	-	0,96
Glicose (mg.L ⁻¹)	-	-	-	0,02

A produção de surfactina em manipueira tem sido amplamente relatada na literatura, principalmente, pelos trabalhos científicos publicados pelo grupo de pesquisa do laboratório de Bioaromas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), liderado pela professora Dra. Glaucia Maria Pastore.

Nitschke e Pastore (2003) testaram cinco diferentes tipos de preparo da manipueira como meio de cultura para a produção de biossurfactante por um isolado do tipo selvagem de *B. subtilis*. Os pesquisadores verificaram que houve crescimento e produção de biossurfactante em todos os tipos de manipueira testados.

Em um estudo subsequente Nitschke e Pastore (2004) utilizaram duas cepas de *B. subtilis* para a produção de biossurfactante em manipueira. Ambas as cepas testadas, *B. subtilis* ATCC 21332 e *B. subtilis* LB5a, exibiram boa atividade superficial e geraram um produto similar à surfactina.

Nitschke, Ferraz e Pastore (2004) avaliaram uma combinação de alguns isolados bacterianos para a produção de biossurfactante. Eles utilizaram melão, soro de leite e manipueira, como substrato alternativo, em comparação ao meio de cultura convencional. Os resultados iniciais demonstraram que muitos isolados foram aptos a crescer e exibir excelente atividade superficial quando suplementados com a manipueira.

A fim de ampliar os estoques de substrato para a produção mais econômica de biossurfactante, Nitschke e Pastore (2006) investigaram a produção e as propriedades de um biossurfactante sintetizado pela cepa de *B. subtilis* LB5a e adotaram, para tanto, manipueira como substrato. Os autores concluíram que o produto obtido pode ser muito útil para aplicação em locais de condições ambientais extremas bem como destacaram que a manipueira é um meio adequado para a biossíntese de biossurfactante.

Barros et al. (2008b) relataram a produção de biossurfactante por *B. subtilis* LB5a, em escala piloto e valeram-se de manipueira como substrato. O estudo foi conduzido com a utilização da mesma clarificada por aquecimento, em um bioreator piloto com volume de 40 litros, adaptado para a coleta simultânea da espuma durante o processo fermentativo. O biossurfactante foi precipitado da espuma e apresentou-se como um bom agente tensoativo.

A manipueira foi identificada como um bom substrato para a produção de biossurfactante.

1.3.5 Características da surfactina produzida em manipueira

A caracterização estrutural de um biossurfactante produzido em manipueira foi realizada primeiramente por Nitschke; Pastore (2004) em espectroscopia de infravermelho (FTIR). O espectro obtido do biossurfactante semipurificado produzido por *Bacillus subtilis* LB5a apresentou-se muito similar ao espectro da surfactina comercial testada.

No estudo subsequente, Nitschke; Pastore (2006) realizaram a caracterização do biossurfactante produzido em manipueira pelo *B. subtilis* LB5a. O biossurfactante obtido apresentou um índice de retenção pelo cromatógrafo de camada delgada muito similar à surfactina padrão testada. As análises indicaram que os conteúdos lipídico e proteico obtidos desse biossurfactante foram de 53,6% e 38,5%, respectivamente, e a presença de quatro aminoácidos: ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina, nas frações: 1:1:1,2:3,4. O biossurfactante apresentou concentração micelar crítica (CMC) de 33 mg.L⁻¹, tensão superficial de 26,6 mN/m e tensão interfacial de 0,97 mN/m. O biossurfactante cru, com concentração de 3 g.L⁻¹ no extrato bruto demonstrou ser um potente agente superfície-ativo, além de resistência à exposição a elevada temperatura (100 °C), estabilidade à autoclavagem e estocagem em baixa temperatura (-18 °C) por longo período de tempo (6 meses), tolerância para alta salinidade (acima de 20% NaCl) e tolerância a ampla faixa de pH, ao formar emulsões estáveis com vários hidrocarbonetos.

Barros et al. (2008b) obtiveram um biossurfactante em meio de manipueira com rendimento de 2,4 g.L⁻¹. Ele apresentou boa atividade superficial, com redução da tensão superficial do meio de 51 para 27 mN.m⁻¹ e CMC de 11 mg.L⁻¹.

Em outro estudo, Barros et al. (2008a) testaram em escala piloto, a estabilidade do biossurfactante produzido em manipueira por *B. subtilis* frente a condições extremas bem como a capacidade emulsificante em misturas de óleos e hidrocarbonetos em água. A concentração micela crítica (CMC) encontrada foi de 12 mg.mL⁻¹, redução de tensão superficial de 72,31 para 27,01 mN.m⁻¹. O biossurfactante foi estável à temperatura de 100 °C por 140 minutos e a 121 °C por até 60 minutos, à concentração de 2,5 a 20% de NaCl e na faixa de pH de 6 a 10. Em relação ao índice de emulsão com 24 horas, o biossurfactante mostrou elevados valores para diversos hidrocarbonetos cíclicos e alifáticos, além de óleos vegetais com diferentes perfis de ácidos graxos.

Quadros, Duarte e Pastore (2011) avaliaram a atividade biológica da mistura da supracitada surfactina e da lipase alcalina proveniente de *Fusarium oxysporum* e observaram que a presença da lipase não interferiu nas propriedades de atividade superficial do biossurfactante.

1.3.6 Capacidade de produção de metano por um consórcio microbiano

Embora a surfactina seja um biossurfactante bastante eficiente, poucos estudos têm sido desenvolvidos com este biossurfactante para aplicação na área ambiental, quando comparado com os biossurfactantes do tipo ramnolípídeo (MULLIGAN, 2005).

Mesmo diante de algumas pesquisas que demonstram como os biossurfactantes apresentam baixa toxicidade aos organismos, convém ressaltar que os surfactantes do tipo aniônico ou neutros são relatados como compostos tóxicos a organismos, como em cladóceros e bactérias (Romanelli et al., 2004), organismos marinhos (Resgalla; Laitano, 2002) bem como apresentaram toxicidade às bactérias metanogênicas presentes em um biodigestor anaeróbio (PETRUY; LETTINGA, 1997).

Petry e Lettinga (1997) ao testarem o surfactante sintético aniônico dodecilsulfato de sódio, utilizado para preparar emulsão de efluente com gordura de leite, observaram que o surfactante utilizado para formar a emulsão causou inibição de 50% da máxima atividade metanogênica específica, quando presente em concentração de 22 mg. L⁻¹, e inibição de 80% quando em concentração de 55 mg. L⁻¹.

Nesse sentido, Florentino et al. (2010) destacam que o sucesso de um processo anaeróbio em reatores depende fundamentalmente da manutenção de uma biomassa com elevada atividade microbiológica e resistente a choques. A busca por um parâmetro que pudesse fornecer informações a respeito da biomassa ativa metanogênica de lodos anaeróbios levou à proposição de um teste para avaliar a Atividade Metanogênica Específica (AME) (AQUINO et al., 2007).

A AME do lodo é definida como a capacidade máxima de produção de metano por um consórcio de microrganismos anaeróbios realizada em condições controladas de laboratório, para viabilizar a atividade bioquímica máxima de conversão de substratos orgânicos a biogás (AQUINO et al., 2007).

Esse teste consiste em incubar uma pequena quantidade de biomassa, em meio que contenha substratos e nutrientes, a fim de medir a quantidade de gás produzido por unidade de tempo e por unidade de massa bacteriana. O teste além de auxiliar no controle de operação dos reatores também pode ser útil para a determinação da degradabilidade e a toxicidade de efluentes e/ou substâncias em condições anaeróbias (POETSCH; KOETZ, 1998).

Há diferentes métodos para a medição do biogás produzido no teste de AME. O método volumétrico se baseia na determinação do volume de biogás ou metano produzido em um frasco reacional que contém o lodo a ser testado. No método do volume e composição do biogás, os frascos são inoculados com lodo e solução de nutrientes, e incubados a 30 °C por um período de 7 a 20 dias (AQUINO et al., 2007). Assim, a partir de quantidades conhecidas de biomassa (gramas de SSV) e de substrato (gramas de DQO),

sob condições pré-estabelecidas, verifica-se a produção de metano ao longo do período de teste. A AME é então calculada pelas taxas de produtividade máxima de metano ($\text{mL CH}_4/\text{g SSV.h}$ ou $\text{g DQO}_{\text{CH}_4}/\text{g SSV.d}$) (CHERNICHARO, 1997).

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 Origem e produção do biossurfactante

O biossurfactante foi produzido no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP) e a avaliação e a purificação foram realizadas no Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da mesma instituição (FEA/UNICAMP).

A manipueira utilizada como substrato na produção do biossurfactante foi coletada após a etapa de prensagem da mandioca, em uma indústria produtora de farinha localizada no município de Santa Maria da Serra, SP.

No Laboratório de Bioaromas, a manipueira passou por tratamento prévio para ser utilizada como meio de cultivo ao microrganismo produtor do biossurfactante. O tratamento consistiu na homogeneização, fervura, resfriamento e centrifugação a 9500 rotações por minuto (rpm) por 11 minutos a 5 °C. O sobrenadante obtido foi coletado e mantido congelado até o uso. De acordo com Christé et al. (2007), o tratamento térmico promove a hidrólise mais acentuada dos compostos cianídricos e a consequente volatilização das formas de cianeto livre (HCN) para o ambiente, logo a torna menos tóxica.

A caracterização da manipueira tratada foi realizada no Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) campus de Cascavel e apresenta as características descritas na Tabela 2.

Tabela 2 Caracterização da manipueira utilizada como meio de cultura para a obtenção do biossurfactante.

Parâmetros	Resultados	Metodologias	Métodos
Açúcares Redutores (g.L ⁻¹)	35,30	Somogyi-Nelson (EMBRAPA, 2013)	Colorimétrico
Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	48,17	Fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956)	Colorimétrico
Carbono Orgânico Total (COT) (mg.L ⁻¹)	4,61	Analizador TOC Shimadzu®	Combustão catalítica
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg.L ⁻¹)	60406	APHA et al. (2005)	5220 D
Ferro (mg.L ⁻¹)	1,16	APHA et al. (2005)	Digestão nitroperclórica
Fósforo (mg.L ⁻¹)	0,4	APHA et al. (2005)	4500 P E
Manganês (mg.L ⁻¹)	1,91	APHA et al. (2005)	Digestão nitroperclórica
Nitrogênio Total Kjeldahl (mg.L ⁻¹)	771	APHA et al. (2005)	4500-NorgC
pH	5,7	APHA et al. (2005)	4500 H
Zinco (mg.L ⁻¹)	0,72	APHA et al. (2005)	Digestão nitroperclórica

1.4.2 Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo produtor do biossurfactante surfactina em manipueira, a bactéria *Bacillus subtilis* linhagem LB5a, estava armazenado em ágar nutriente a 4 °C, e pertence ao Laboratório de Bioaromas da FEA/UNICAMP (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

Alçadas do meio de cultura do microrganismo em questão foram transferidas para frascos Erlenmeyer que continham 150 mL de meio nutriente. Os frascos foram mantidos a 30 °C por 12 horas e 150 rpm em agitador rotativo para crescimento do inóculo. O meio de cultura utilizado para o desenvolvimento do inóculo (g.L⁻¹ água destilada) era composto de: extrato de carne: 1,0; extrato de levedura: 2,0; peptona: 5,0 e cloreto de sódio: 5,0 (BARROS et al. 2008b). Foram preparados 4 litros de inóculo nas condições acima descritas.

1.4.3 Produção do biossurfactante

O cultivo do microrganismo para a produção de biossurfactante em manipueira foi realizado em biorreator piloto, marca New Brunswick Scientific®, modelo Mobile Pilot Plant Fermentor 8000 MP 80 (Figura 7).



Figura 7 Biorreator utilizado para cultivo do microrganismo em manipueira e produção do biossurfactante.

O volume de 56 litros da manipueira previamente tratada foi adicionado e esterilizado no próprio biorreator, nas condições de 1 atm, 121 °C, por 20 minutos, e o pH do meio não

foi ajustado. Após o resfriamento do meio de cultura, foi inoculado o *Bacillus subtilis* LB5a na porcentagem de 7% (4 L de inóculo), cujo total de cultivo foi de 60 litros. A medida da concentração de células do inóculo foi obtida por leitura em espectrofotômetro de luz visível, marca Beckman Coulter®, modelo DU640, com comprimento de onda de 660 nm.

As condições experimentais do biorreator para a obtenção do biossurfactante foram: aeração de 20 L.min⁻¹, agitação de 150 rpm e temperatura de 35 °C (BARROS et al., 2008b). O cultivo foi mantido por 48 horas nessas condições.

Uma amostra do meio de cultura e outra da espuma produzida foram retiradas após 36 horas do início do cultivo e foram avaliadas quanto ao número de células viáveis pela técnica *spread plate* ao utilizar ágar nutriente como meio de cultura (NITSCHKE; PASTORE, 2003; NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

Os resultados do plaqueamento demonstraram que na amostra do meio de cultura do biorreator obteve-se a concentração de $5,3 \cdot 10^9$ Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹), e na amostra da espuma obteve-se $3,5 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹.

Na Figura 8 está apresentada a síntese dos procedimentos de cultivo do microrganismo para obtenção do biossurfactante.

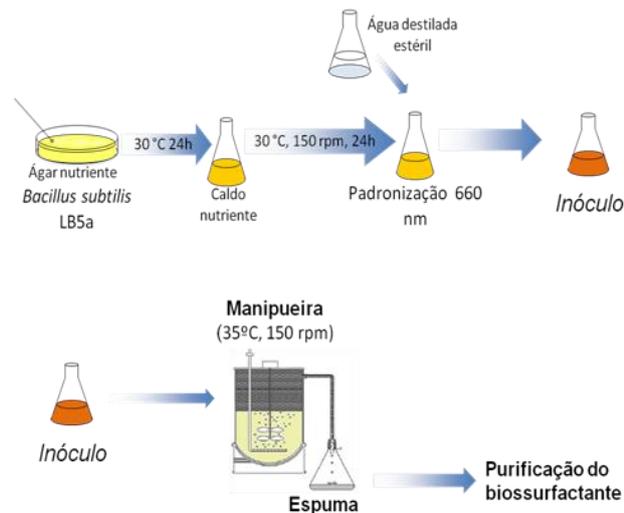


Figura 8 Etapas de cultivo do *Bacillus subtilis* LB5a e obtenção do biossurfactante surfactina.

A espuma produzida no cultivo foi coletada do biorreator com auxílio de uma mangueira de silicone estéril, colapsada à temperatura ambiente, e então submetida às análises e ao processo de semipurificação para obtenção dos dados do biossurfactante.

1.4.4 Extração e semipurificação do biossurfactante

A espuma colapsada foi centrifugada a 9500 rpm por 11 minutos a 5 °C a fim de remover as células microbianas. O sobrenadante obtido teve seu pH ajustado para 2, a

partir de uma solução de HCl 6N, e mantido em repouso por 12 horas para decantação. Seguiu-se então nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, e o precipitado foi neutralizado com solução de NaOH 6N. Após a completa dissolução, o extrato de biossurfactante foi seco em estufa a 80 °C, destorroado e esterilizado em autoclave a 121 °C/1atm/15min (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999; BARROS et al., 2008b) (Figura 9).

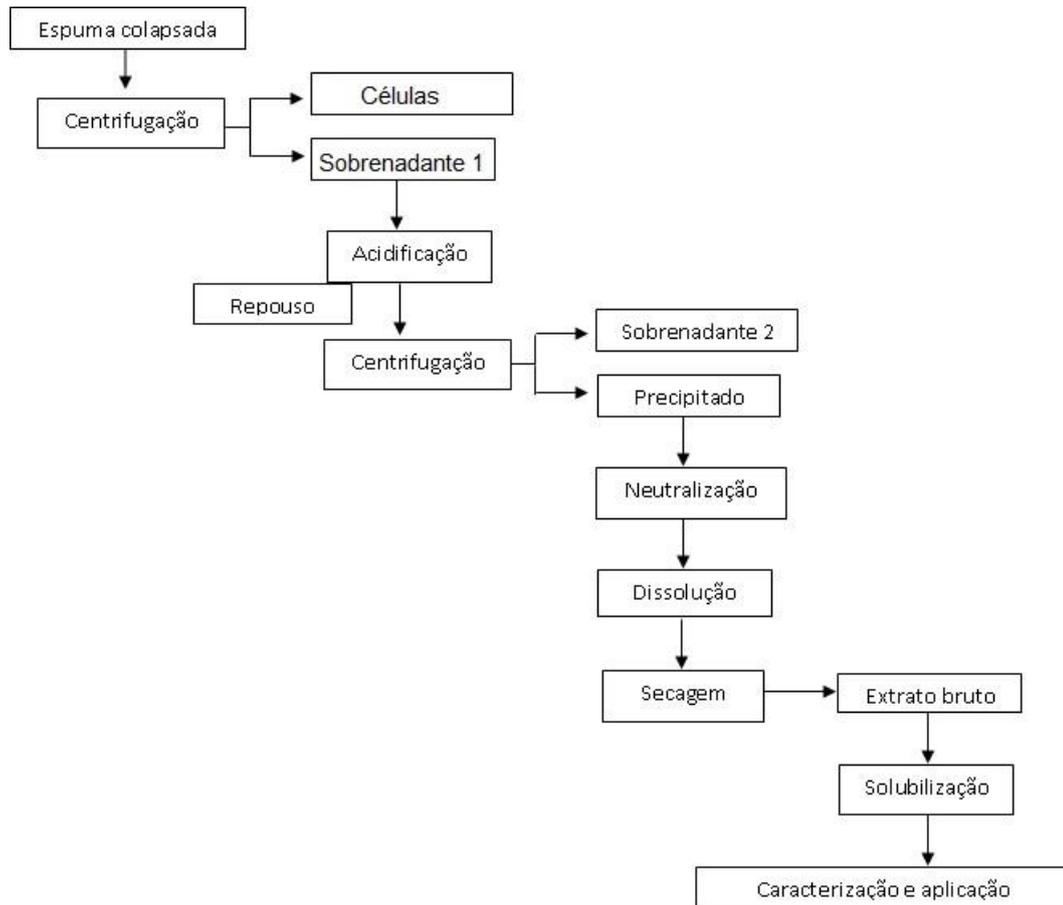


Figura 9 Fluxograma de extração e semipurificação do biossurfactante.

Ao final, obteve-se um extrato de biossurfactante em pó (extrato bruto), de coloração marrom (Figura 10), o qual foi armazenado congelado até sua utilização.



Figura 10 Extrato em pó do biossurfactante obtido no cultivo de *B. subtilis* LB5a em manipueira.

Esse biossurfactante é dito semipurificado, pois não passa pelo processo de purificação completo, que consiste em dissolver o produto seco em água destilada sob pH 7,0, secá-lo e extraí-lo com clorofórmio:metanol (6:15) (NITSCHKE; PASTORE, 2006).

A caracterização da Demanda Química de Oxigênio (DQO) do biossurfactante obtido foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA et al., 2005).

1.4.5 Caracterização do biossurfactante

1.4.5.1 Índice de emulsificação (IE%)

O biossurfactante obtido foi avaliado quanto à sua capacidade de formar e estabilizar emulsões, pois essa é uma das características mais importantes a serem consideradas para a aplicação prática de um surfactante (COSTA et al., 2010). O Índice de Emulsificação (IE) é um importante parâmetro de avaliação do poder de um emulsificante e da estabilidade de emulsão (COOPER; GOLDENBERG, 1987).

O IE do biossurfactante foi obtido conforme metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Foram adicionados 6 mL de compostos hidrofóbicos (gasolina comum, óleo diesel, óleo de soja e óleo de girassol) e 4 mL de uma solução 1 mg.mL⁻¹ do extrato bruto de biossurfactante ou de dodecil sulfato de sódio (SDS) em um tubo de ensaio com tampa rosqueável. O SDS é um surfactante aniônico sintético e foi utilizado a fim de comparar seu IE com o do biossurfactante.

Cada composição foi realizada em triplicata, homogeneizada em agitador de tubos em velocidade máxima por 2 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente. Após 24, 48, 72 e 96 horas foram efetuadas medidas de altura da Camada Emulsionada (CE) e da Altura Total (AT) dos líquidos nos tubos.

O índice de emulsificação de cada surfactante (IE) foi obtido por meio da Equação 1:

$$IE (\%) = \left(\frac{CE}{AT} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1).}$$

1.4.5.2 Caracterização e quantificação do biossurfactante por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O biossurfactante produzido por *B. subtilis* LB5a também foi caracterizado e quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) além de utilizar-se

surfactina comercial (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) com $\geq 98\%$ de pureza como padrão. As análises de CLAE foram realizadas em um equipamento *Prominence* (Shimadzu[®]) acoplado com detector SPD UV, coluna C18 (4,6 x 150 mm cm partículas de 5 μm , marca Kromasil[®]) em temperatura de 30 °C. A fase móvel consistiu na mistura de acetonitrila e ácido trifluoracético (TFA 3,8 mmol.L^{-1}) na proporção de 80:20 v/v, com fluxo de 0,6 mL.min^{-1} (SLIVINSKI, 2012).

A surfactina padrão (1 mg.mL^{-1}) e as amostras do biosurfactante semipurificado (1 mg.mL^{-1}) foram dissolvidas em acetonitrila e metanol (1:1 v/v), e 20 μL foram usados para injeção. Os picos foram detectados a 205 nm e comparados com o tempo de retenção do padrão comercial (YEH; WEI; CHANG, 2005 citado por SLIVINSKI, 2012).

1.4.5.3 Determinação do poder tensoativo

Uma amostra de aproximadamente 10 mL da espuma colapsada foi utilizada para determinar a tensão superficial e a Diluição Micelar Crítica (DMC^{-1} e DMC^{-2}) (BARROS et al., 2008b). A espuma colapsada foi diluída 10 (DMC^{-1}) e 100 vezes (DMC^{-2}) com água destilada.

A determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) foi realizada ao medir-se a tensão superficial (TS) a partir de diluições sucessivas (com água destilada) de uma solução aquosa de 300 mg.L^{-1} da surfactina produzida nesse trabalho, segundo a técnica descrita por Sheppard e Mulligan (1987).

Para as investigações, foi utilizado o equipamento tensiômetro K12, Processor Tensiometer, Krüss (Hamburgo, Alemanha) (Figura 11). As análises foram feitas pelo método do anel, que utiliza um anel de platina denominado anel de Du Nouy. Nesse método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. A força adicional exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido se rompe dá a medida da tensão superficial (KRÜSS, 1994 citado por SLIVINSKI, 2012).

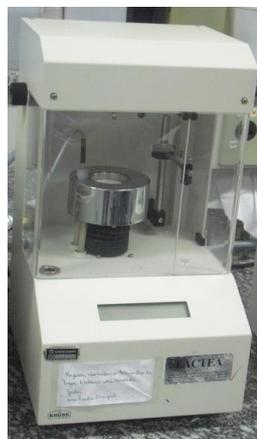


Figura 11 Tensiômetro utilizado para determinação da tensão superficial e da DMC.

1.4.6 Origem, coleta e caracterização do lodo utilizado como inóculo no tratamento anaeróbio

O lodo utilizado como inóculo nos testes de biodigestão anaeróbia, do efluente de abatedouro de aves, foi coletado em um biodigestor anaeróbio presente na planta de tratamento de efluentes de uma indústria processadora de mandioca, localizada na região oeste do Paraná.

Tal lodo desenvolveu-se aderido a um meio suporte composto por pedaços de bambu, que estavam acondicionados em bolsas de ráfia dentro do biodigestor (Figura 12).



Figura 12 Lodo anaeróbio aderido ao suporte.

O lodo aderido ao suporte foi removido com espátula, homogeneizado e armazenado em geladeira a 4 °C. Antes da sua utilização e caracterização buscou-se ativar a biomassa do lodo por meio da sua incubação em shaker a 100 rpm e 35 °C por 7 dias. A caracterização do lodo contemplou as seguintes análises: série de Sólidos Suspensos (SS): Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Fixos (SSF) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), de acordo com a metodologia descrita em APHA et al. (2005) e Atividade Metanogênica Específica (AME).

1.4.6.1 Atividade Metanogênica Específica do lodo anaeróbio

A Atividade Metanogênica Específica (AME) do lodo é definida como a capacidade máxima de produção de metano por um consórcio de microrganismos anaeróbios, realizada em condições controladas de laboratório. Os ensaios para a determinação da AME desse lodo foram baseados nos trabalhos de Chernicharo (1997), Rocha et al. (2001), Alves et al. (2005) e Aquino et al. (2007) que utilizam o método de medição direta do volume de metano.

Trabalhou-se com uma relação inóculo/substrato de 2 g SSV.L⁻¹ de concentração celular para 2 g DQO.L⁻¹ em ácidos orgânicos, ou seja, uma relação 1:1, em regime estático e temperatura de 35 °C em câmara BOD. De acordo com Chernicharo (1997), não há

consenso na literatura quanto à influência da agitação intermitente e do tipo de agitador usado nos testes de AME.

Foram utilizados frascos de vidro de 600 mL com tampa de borracha, cujos 500 mL são de volume útil, para uma mistura inóculo + nutrientes + substrato.

A composição das soluções estoques de nutrientes e de ácidos voláteis usados no teste da AME encontra-se nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 Composição das soluções estoque de nutrientes.

Solução	Nutriente	Concentração (mg.L ⁻¹)	Finalidade
1	NH ₄ Cl	500	Macronutriente
	KH ₂ PO ₄	650	Macronutriente e fonte de alcalinidade
	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	150	Macronutriente e fonte de alcalinidade
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	100	Macronutriente
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	100	Macronutriente
	NaHCO ₃	1000	Fonte de alcalinidade
	MgCl ₂	100	Macronutriente
	Na ₂ S . 7H ₂ O	100	Agente redutor
	Extrato de levedura	50	Fonte de vitaminas
	2	FeCl ₃ . 6H ₂ O	2000
ZnSO ₄ . 7H ₂ O		106	
CuSO ₄ . 5H ₂ O		38	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O		50	
AlCl ₃ . 6H ₂ O		90	
CoCl ₂ . 6H ₂ O		2000	
NiCl ₂ . 6H ₂ O		50	
H ₃ BO ₃		50	
HCl concentrado		1 mL.L ⁻¹	
EDTA		1000	

Fonte: Adaptado de Chernicharo (1997); Rocha et al. (2001); Alves et al. (2005).

Tabela 4 Composição da solução estoque de ácidos orgânicos.

Ácidos orgânicos	Concentração (g.L ⁻¹)	DQO (g.L ⁻¹)
Acético	28	29,88
Propiônico	28	42,28
Butírico	28	50,96

Fonte: Alves (2005).

O teste da AME seguiu as seguintes etapas:

- Determinação da concentração de SSV (g.L⁻¹) presente no lodo a ser analisado, de acordo com a metodologia descrita em APHA et al. (2005);
- Determinação do volume de lodo a ser adicionado nos frascos, a fim de se obter a concentração final na mistura (lodo+nutrientes+substrato) igual a 2 g SSV.L⁻¹;
- Determinação do volume de substrato (mistura de ácidos) a ser adicionado nos frascos, a fim de se obter a concentração final de 2 g DQO.L⁻¹. De acordo com Alves (2005), tomam-se 16,24 mL da solução estoque de ácidos, para um volume útil de 400 mL da

solução final que resulta em um fator de diluição de 24,63 vezes. Dessa forma, a concentração total de ácidos orgânicos dentro do frasco é de aproximadamente 5 gDQO.L⁻¹. Assim, para um volume útil de 500 mL e concentração requerida de 2 gDQO.L⁻¹, foram utilizados 8,12 mL da solução estoque de ácidos orgânicos;

d) Determinação do volume de solução tampão e de nutrientes: sabe-se que o volume total da mistura foi estabelecido em 500 mL e o volume da solução tampão e de nutrientes pode ser obtido, subtraem-se do volume total os volumes de lodo e de substratos já calculados;

e) Definidos os parâmetros, acrescentou-se o respectivo volume de lodo e da solução de nutrientes aos frascos. No momento da utilização das soluções de nutrientes, adicionou-se 1 mL da solução 2 por litro da solução 1, para se obter uma solução única, a qual foi então adicionada aos frascos reatores;

f) Efetuou-se a incubação prévia do lodo na presença dos nutrientes e na temperatura do teste, mas sem a adição de substrato (ácidos orgânicos), durante um período suficiente para cessar (ou estabilizar) a produção de metano endógena do lodo (em torno de 3 dias). O oxigênio foi purgado com nitrogênio comercial por 5 minutos.

g) Após a incubação prévia, os frascos foram abertos e adicionou-se o volume correspondente da solução estoque de ácidos orgânicos, que totalizou 500 mL;

h) Purgou-se novamente o oxigênio presente nos frascos por borbulhamento com nitrogênio gasoso (pressão de 5 psi, durante 5 minutos) na mistura;

i) Os frascos foram fechados com as tampas de borracha e de plástico e lacrados com cola tipo veda calha;

j) Os frascos foram então conectados, por meio de mangueiras tipo cristal de Ø 60mm aos gasômetros, para a medição volumétrica de gás metano por deslocamento de líquido em uma proveta graduada. Os gasômetros com volume de 250 mL estavam preenchidos com uma solução de NaOH na concentração de 5%, para que houvesse a retenção do CO₂ produzido;

k) Os frascos foram incubados em câmara BOD, sem agitação, à temperatura de 35 °C;

l) Os ensaios foram realizados em triplicata e com frascos em branco, nos quais os ácidos voláteis foram substituídos por água destilada, mas com inóculo e nutrientes;

m) As leituras de volume de metano produzido foram observadas pela medição do volume de NaOH, deslocado para o frasco de descarte e efetuadas com intervalos de duas horas no primeiro dia de incubação, e de duas a três vezes ao dia nos dias subsequentes até que a produção de biogás estabilizou-se;

n) A AME real do lodo foi obtida ao subtrair-se o valor de AME do controle (branco), do valor de AME obtida com a adição de substrato (ácidos orgânicos).

Na Figura 13 é apresentado o aparato experimental do teste de AME.

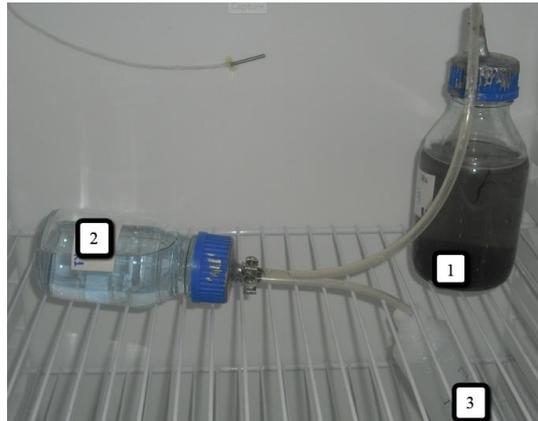


Figura 13 Aparato experimental utilizado no teste de atividade metanogênica específica: (1) reator; (2) gasômetro; (3) frasco de coleta do NaOH.

Foi construído, pelo *software* Excel, um gráfico temporal de produção acumulada de metano, observada pelo deslocamento de volume do NaOH em litros, em função do tempo de incubação (dias).

A determinação da AME foi calculada ao dividir-se a máxima taxa de variação da produção de metano pela concentração da biomassa (em SSV de lodo) aplicada nos reatores. Obteve-se então a AME em $\text{mL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. A partir da Equação 2 (Chernicharo, 1997) pode-se fazer a conversão da unidade para $\text{gDQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

$$V_{\text{CH}_4} = \frac{\text{DQO}_{\text{CH}_4}}{K(T)} \text{ e } K(t) = \frac{PK}{R(273+T)} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

V_{CH_4} é o volume de metano produzido (em L);

T é a temperatura operacional do reator (em °C);

K (t) é o fator de correção para a temperatura operacional do reator (em $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$);

P é a pressão atmosférica (em atm); K é a DQO correspondente a um mol de CH_4 ($64 \text{ gDQO} \cdot \text{mol}^{-1}$);

R é a constante dos gases ($0,08206 \text{ atmL} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).

1.4.7 Efeito inibitório do biossurfactante sobre o lodo anaeróbio

O efeito inibitório do biossurfactante sobre as bactérias presentes no lodo anaeróbio a ser utilizado como inóculo, na biodigestão anaeróbia do efluente de abatedouro de aves, passou por avaliação com testes semelhantes ao apresentado no item 1.4.6.1 sobre a AME,

foram utilizados o lodo anaeróbio, a solução de macro e micronutrientes (Tabela 3) e o substrato (ácidos orgânicos) (Tabela 4).

Os ensaios ocorreram em regime de batelada; utilizaram-se frascos de vidro de 600 mL, dos quais 500 mL eram de volume útil. A quantidade de lodo utilizada em cada ensaio foi calculada para se manter uma relação DQO inicial: SSV do lodo de 1:1.

O biossurfactante foi dissolvido em água ultrapura em diferentes concentrações a partir da sua CMC obtida, em soluções com concentrações de 5,6; 28 e 140 mg.L⁻¹.

A partir de uma solução de biossurfactante de 500 mg.L⁻¹ de concentração, os tratamentos aplicados em triplicatas foram conforme os apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Tratamentos aplicados nos ensaios de inibição da surfactina sobre o lodo anaeróbio.

Tratamento	Lodo (mL)	Surfactina (mL)	Nutrientes (mL)	Ácidos orgânicos (mL)
0 Controle	51,8	0	440,8	8,12
T1 = 5,6 mg.L ⁻¹ BS	51,8	5,6	434,4	8,12
T2 = 28 mg.L ⁻¹ BS	51,8	28	412,0	8,12
T3 = 140 mg.L ⁻¹ BS	51,8	140	300,0	8,12

BS = Biossurfactante.

O pH das misturas de cada tratamento não foi ajustado e apresentou-se em média de 5 ±0,5. Os frascos que continham as composições dos tratamentos foram submetidos à purga do oxigênio com N₂ gasoso por 15 minutos, fechados com tampas de borracha e de plástico e incubados em BOD a 35 °C por 22 dias (DAMASCENO, 2013).

O efeito tóxico ou inibitório foi avaliado por meio da medida da eficiência de remoção de DQO solúvel e produção de metano monitorado diariamente por meio do deslocamento da solução de NaOH presente no gasômetro. Alíquotas para a determinação da DQO inicial foram tomadas antes do contato com o lodo anaeróbio. A DQO solúvel final (obtida através da filtração do sobrenadante em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 µm (APHA et al., 2005)) foi determinada no último dia do ensaio (VALLADÃO, FREIRE; CAMMAROTA, 2007).

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1 Caracterização do biossurfactante obtido

1.5.1.1 Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão

Na Tabela 6 são apresentados os Índices de Emulsificação (IE) obtidos do biossurfactante e do surfactante químico (SDS) a 98% com os hidrocarbonetos e óleos vegetais, após os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Tabela 6 Índices de emulsificação do biossurfactante surfactina e do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS).

Composição	Período (horas)				Redução IE (%) após 96 hs.
	24	48	72	96	
	Índice de emulsificação (%)				
Gasolina+Biossurfactante	61,31	60,50	60,00	58,88	3,95
Gasolina+SDS	60,00	60,00	58,71	58,38	2,70
Diesel+ S Biossurfactante	74,41	74,41	74,41	72,02	3,21
Diesel+SDS	71,10	71,10	71,10	71,00	0,14
Óleo soja+ Biossurfactante	63,68	58,53	55,09	51,85	18,57
Óleo soja+SDS	78,74	78,74	78,74	78,71	0,03
Óleo girassol+ Biossurfactante	61,90	61,54	55,77	47,62	23,07
Óleo girassol+SDS	76,41	76,41	76,34	75,52	1,16

Ao serem comparados os resultados observados no presente trabalho com os obtidos por Barros et al. (2008), pode-se dizer que o biossurfactante apresentou elevados valores de IE, até mesmo levemente superiores aos do surfactante sintético SDS para os hidrocarbonetos gasolina e diesel. O fato supra caracterizou-o, portanto, como bom surfactante quanto ao índice de emulsificação, inclusive para ser aplicado na área ambiental.

Verifica-se por meio da porcentagem de redução da camada de emulsão após 96 horas que no geral, o biossurfactante mostrou-se com estabilidade levemente inferior ao surfactante sintético.

Observou-se também que o biossurfactante mostrou-se levemente mais estável com os hidrocarbonetos do que com os óleos vegetais, o que difere de Costa et al. (2010). Os autores avaliaram as propriedades de um ramnolípideo produzido por *P. aeruginosa* L2-1 em manipueira e verificaram que o biossurfactante foi capaz de formar emulsões estáveis por mais de 30 dias com querosene, óleo de soja e benzeno. Também verificaram que as emulsões foram formadas mais eficientemente em compostos que contêm longas cadeias de ácidos graxos, como os triglicerídeos que predominam em óleos e gorduras.

Na Figura 14 é apresentado o aspecto da camada emulsionada obtida com cada um dos hidrocarbonetos e óleos vegetais em contato com o biossurfactante.

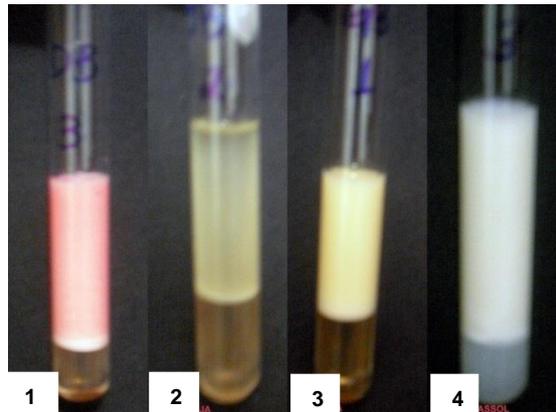


Figura 14 Tubos com os hidrocarbonetos e óleos vegetais emulsionados com o biossurfactante. Em ordem: (1) diesel, (2) óleo de soja, (3) gasolina e (4) óleo de girassol.

1.5.1.2 Caracterização e quantificação do biossurfactante por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A composição do biossurfactante produzido pela cepa de *B. subtilis* LB5a já havia sido determinada por Nitschke e Pastore (2004) como o biossurfactante surfactina, o que facilitou sua quantificação por CLAE. Na Figura 15, está apresentado o cromatograma com os perfis de eluição da surfactina comercial utilizada como padrão.

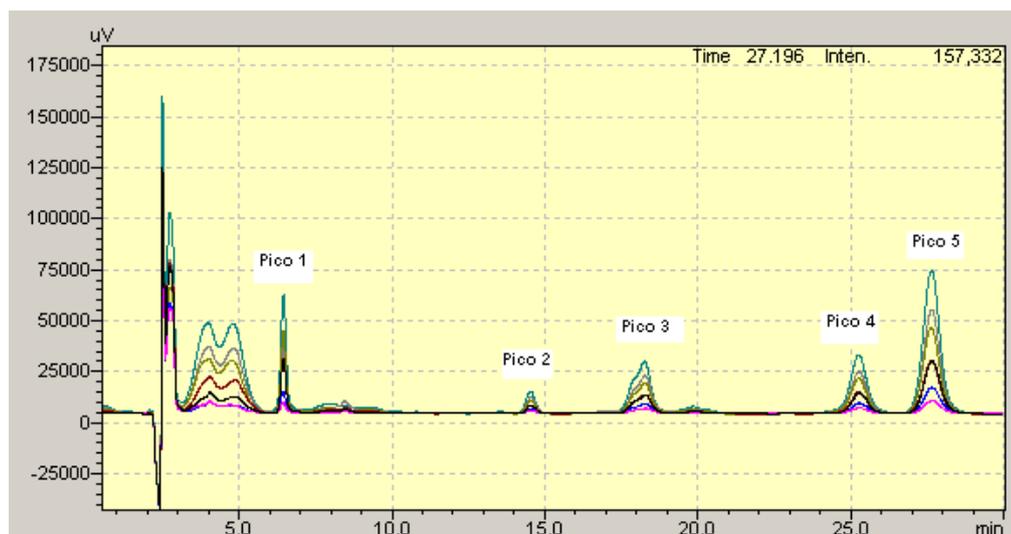


Figura 15 Perfis de eluição das diferentes concentrações de surfactina padrão (Sigma-aldrich) obtidos por CLAE.

Os tempos de retenção dos picos obtidos para a surfactina comercial foram: pico 1: 6,4 min.; pico 2: 14,5 min.; pico 3: 18,2 min.; pico 4: 25,2 min. e pico 5: 27,6 min.

As diferentes cores que compõem os picos de retenção são referentes às sobreposições das cinco concentrações de surfactina utilizadas para compor a curva padrão: 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,0 mg.mL⁻¹.

Na Figura 16 é apresentado o cromatograma com os perfis de eluição do biossurfactante obtido do cultivo de *B. subtilis* LB5a em manipueira.



Figura 16 Perfil de eluição do biossurfactante surfactina de *B. subtilis* LB5a obtido por CLAE.

No cromatograma do biossurfactante foi possível identificar os picos nos respectivos tempos de retenção observados no cromatograma da surfactina padrão.

A cepa de *B. subtilis* LB5a produziu os mesmos cinco homólogos observados por Slivinski (2012), a qual avaliou a produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido ao utilizar bagaço de cana e okara como substrato.

Outros picos também foram observados devido à presença de impurezas. Por se tratar de um extrato bruto, em que a purificação foi realizada de forma parcial, é compreensível a presença das mesmas.

Dessa forma, foi possível garantir que o biossurfactante produzido é a surfactina, além de determinar-se também a concentração da mesma no extrato bruto obtido, a qual foi calculada a partir da integração da área total dos picos dos homólogos em referência à equação da curva padrão de calibração. Da curva de calibração foi obtida a seguinte equação da reta: $y = 6E+06x - 158516$ e o coeficiente de determinação $R^2 = 0,999$, o que tornou possível obter a concentração de surfactina em 1 mg de amostra. A partir de então se concluiu que a quantidade média de surfactina presente no extrato bruto foi de 0,3 mg.mL⁻¹.

Diversos pesquisadores relatam em seus trabalhos a concentração do biossurfactante produzido nas condições específicas. Felix (2012) avaliou a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ao utilizar suco de caju como substrato e obteve 11,17% de concentração de surfactina no biossurfactante semi-purificado.

Santos (2011) produziu biossurfactante com a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a partir de glicerol e, após o processo de purificação, observou aproximadamente 6,57% de ramnolípido no extrato bruto do biossurfactante obtido.

Na produção de um biossurfactante do tipo ramnolípido por *Pseudomonas aeruginosa*, Kronemberger (2007) obteve 44,89% de ramnose no extrato bruto do biossurfactante obtido.

1.5.1.3 Atividade superficial do biossurfactante obtido

A avaliação da espuma do extrato bruto demonstrou que o biossurfactante produzido apresentou excelente atividade tensoativa e reduziu a tensão superficial da água de 72,3 para 25,97 mN.m⁻¹. Os valores corroboram com os reportados por Nitschke e Pastore (2006) e Barros et al. (2008a). As Diluições Micelares Críticas (DMC) DMC⁻¹ e a DMC⁻² observadas foram de 26,98 e 31,27 mN.m⁻¹, respectivamente, e o valor da CMC mostrou-se próximo ao obtido por Nitschke e Pastore (2006), que foi de 33 mg.L⁻¹.

Para a obtenção da Concentração Micelar Crítica (CMC), após a semipurificação do biossurfactante, o mesmo foi diluído em água ultrapura, e foi obtido um gráfico que avaliou a Tensão Superficial (TS) contra a concentração de surfactina, em que a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva (Figura 17) obtida por cálculo de derivação.

A análise demonstrou que a surfactina obtida apresenta CMC de 28,33 mg.L⁻¹, ou seja, são necessários 28,33 miligramas em um litro para que a surfactina seja capaz de diminuir a TS da água para 26,07 mN.m⁻¹. Dentre os autores que já investigaram a produção de surfactina por *B. subtilis* LB5a ao utilizar manipueira como meio de cultura, Nitschke e Pastore (2006) obtiveram uma CMC de 33 mg.L⁻¹ para a surfactina produzida. Barros et al., (2008a) obtiveram uma CMC de 12,33 mg.L⁻¹, enquanto em outro estudo, Barros et al., (2008b) observaram uma CMC de 11 mg.L⁻¹ nos ensaios em escala de produção-piloto.

As diferenças entre os valores de CMC apresentados são justificadas, provavelmente, pelas diferentes composições dos meios de cultivo, visto que a composição da manipueira pode variar em função de fatores tais como cultivar, idade da planta, tempo de armazenamento e tipo de processamento bem como das condições de cultivo do microrganismo produtor do biossurfactante.

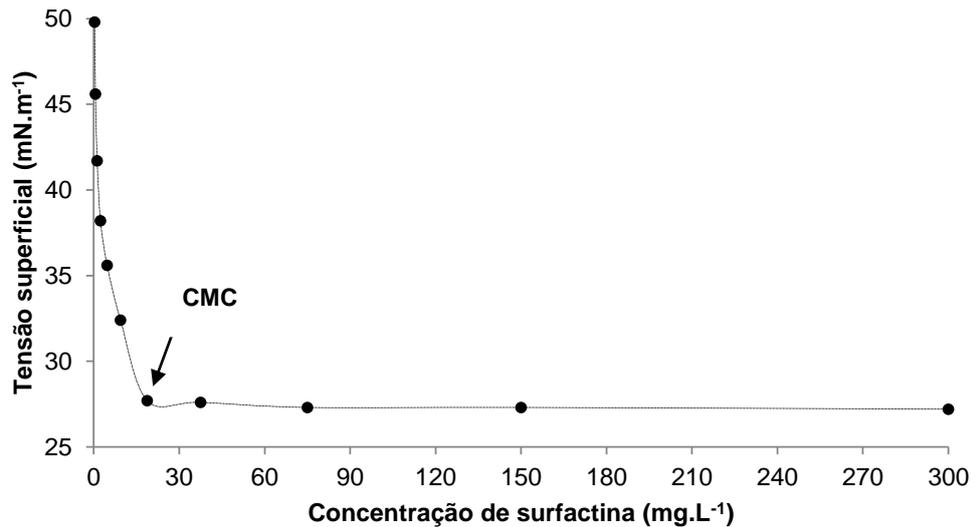


Figura 17 Curva obtida para a diminuição da tensão superficial da água destilada em função da adição de surfactina.

Na Tabela 7 é apresentado o resumo da caracterização do biossurfactante surfactina produzido em manipueira.

Tabela 7 Caracterização físico-química do biossurfactante surfactina produzido por *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira e utilizado nesse trabalho.

Parâmetros	Resultados
Concentração da surfactina (mg.mL ⁻¹)	0,3
Tensão superficial (mN.m ⁻¹)	25,9
Concentração Micelar Crítica (mg.L ⁻¹)	28,3
Índice de emulsificação (%)*	74,4
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (gDQO/g Biossurfactante)	1,26

* Índice de emulsificação obtido com óleo diesel.

A DQO observada foi obtida a partir de uma solução com 500 mg.L⁻¹ de extrato bruto de surfactina diluída em água destilada.

1.5.2 Caracterização do lodo anaeróbio

Na Tabela 8 é apresentada a caracterização do lodo anaeróbio utilizado como inóculo nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

A Atividade Metanogênica Específica (AME) do lodo (0,12 gDQO_{CH₄}.gSSV⁻¹.d⁻¹) foi determinada de acordo com o procedimento descrito no subitem 1.4.6, e mostrou-se compatível com valores observados na literatura: 0,10 – 0,16 gDQO_{CH₄}.gSSV⁻¹.d⁻¹ (Alves et al., 2005) e 0,17 gDQO_{CH₄}.gSSV⁻¹.d⁻¹ (Damasceno, 2013). Portanto, indicou-se que o lodo apresentava boa atividade metanogênica e era adequado para ser usado nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

A análise da série de sólidos suspensos totais foi desenvolvida para se ter conhecimento das propriedades orgânicas e inorgânicas do lodo. Dessa forma, foi possível observar que os SSV, que compreendem a fração orgânica do material, corresponderam a 49% do total de sólidos voláteis.

Tabela 8 Caracterização do lodo anaeróbio a ser utilizado como inóculo nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

Parâmetros	Resultados	Metodologias	Métodos
Atividade Metanogênica Específica (AME) (gDQO _{CH4} .gSSV ⁻¹ .d ⁻¹)	0,12	Chernicharo (1997); Rocha (2001); Alves (2005); Aquino et al. (2007)	Volumétrico
Sólidos Suspensos Totais (mg.L ⁻¹)	40301	APHA et al. (2005)	
Sólidos Suspensos Fixos (mg.L ⁻¹)	20448	APHA et al. (2005)	2540 E
Sólidos Suspensos Voláteis (mg.L ⁻¹)	19852	APHA et al. (2005)	

1.5.2.1 Avaliação da inibição do biossurfactante frente ao lodo anaeróbio

Após o acompanhamento temporal do teste, esse foi finalizado quando se observou a manutenção da produção de metano. Um gráfico temporal de produção acumulada de metano foi construído a partir do software Excel, a qual observada pelo deslocamento de volume do NaOH em mL, em função do tempo de incubação (dias) (Figura 18).

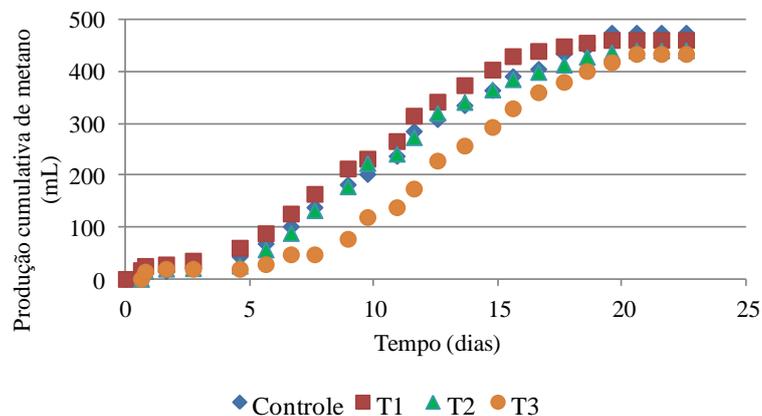


Figura 18 Produção cumulativa de metano durante o período de desenvolvimento do teste da AME.

A determinação da AME foi feita a partir da avaliação da inclinação do trecho reto da curva de produção de metano (trecho de inclinação máxima). Observa-se que dentre os tratamentos aplicados e o controle, houve similaridade no comportamento da produção cumulativa de metano.

Na Tabela 9, estão apresentados os resultados obtidos no ensaio de biodegradabilidade anaeróbia do lodo frente às condições de surfactina: na Concentração

Micelar Crítica (CMC) para esse biossurfactante (28 mg.L^{-1}), em torno de cinco vezes abaixo da CMC ($5,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e em torno de cinco vezes acima da CMC (140 mg.L^{-1}). A CMC foi adotada como parâmetro de referência por indicar a solubilidade do tensoativo na fase aquosa, ou seja, por ser a concentração mínima necessária para que ocorra a redução máxima da tensão superficial (água/ar) e interfacial (água/óleo) (PIRRÔLO, 2006).

Tabela 9 Resultados do ensaio de biodegradabilidade anaeróbia do lodo com adição de diferentes concentrações de surfactina produzida por *B. subtilis* LB5a em manipueira.

Condição [] BS (mg.L^{-1})	DQO _T inicial (mg.L^{-1})	DQO _S final (mg.L^{-1})	DQO remov.	Remoção DQO (%)	Vol. Metano (mL)	AME ($\text{gCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	pH inicial	pH final
0 Controle	1893,3	77,2	1816,1	96	475,6	0,12	5,1	6,8
T1 = 5,6	1862,9	37,8	1825,1	98	461,5	0,12	4,9	6,8
T2 = 28	1893,3	55,5	1837,8	97	441,5	0,11	5,2	6,8
T3 = 140	1905,9	109,1	1796,8	94,2	434,5	0,13	5,2	6,3

BS = biossurfactante surfactina. DQO_T = Demanda Química de Oxigênio Total. DQO_S = Demanda Química de Oxigênio Solúvel.

A solução de surfactina utilizada no ensaio apresentou DQO de $629,3 \text{ mg.L}^{-1}$, e a variação da DQO inicial nos diferentes tratamentos deve-se à adição do biossurfactante em cada condição. Em relação à remoção de DQO, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos, que variaram de 94,2% acima da CMC (T3), 96% de remoção de DQO no controle, 97% para o tratamento na CMC (T2) e 98% para o tratamento abaixo da CMC (T1).

Referente à produção de metano, observa-se que o tratamento controle apresentou a maior produção e o tratamento acima da CMC (T3) apresentou a menor produção de metano, mas com diferenças sutis na produção entre todos os tratamentos.

Na avaliação da AME do lodo, pode-se inferir também que não houve diferença significativa entre os tratamentos, com variação de 0,11 a $0,13 \text{ gCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Esses resultados mostram-se compatíveis com os observados na literatura: $0,10 - 0,16 \text{ gCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Alves et al., 2005) e $0,17 \text{ gCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Damasceno, 2013), logo indicam que o lodo possui boa AME mesmo em contato com a surfactina. Tal fato demonstra que a surfactina não interferiu negativamente no processo biológico, e que pode, portanto, ser utilizada em conjunto com o lodo em ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

1.6 CONCLUSÕES

O biossurfactante produzido pelo cultivo de *Bacillus subtilis* LB5a que utilizou manipueira como substrato foi caracterizado como o lipopetídeo surfactina com concentração de 30% do extrato bruto.

Observou-se que mesmo que não tenha sido totalmente purificada, e isto lhe confere uma vantagem econômica, a surfactina produzida apresentou bom índice de emulsificação e manutenção da estabilidade das emulsões obtidas com os óleos e hidrocarbonetos após 72 horas. Além disso, a CMC obtida, em torno de 28 mg.L^{-1} , é muito adequada e permite a redução da tensão superficial de forma eficiente.

O lodo anaeróbio avaliado apresenta um consórcio microbiano capaz de produzir metano em seu biogás, e é, portanto, adequada a sua utilização para o tratamento anaeróbio de efluentes.

A adição de surfactina, nas concentrações avaliadas, não inibiu a microbiota presente no lodo anaeróbio e a AME do lodo manteve-se inalterada. Dessa maneira não apresenta inibição aos microrganismos. Assim, esse biossurfactante pode ser utilizado na área ambiental como no tratamento anaeróbio de efluentes agroindustriais.

1.7 REFERÊNCIAS

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington, DC: APHA 2005.

ALVES, R. G. C. M. et al. Digestores anaeróbios para tratamento de dejetos suínos – Avaliação de partida para diferentes configurações de reatores. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Anais...** Campo Grande, 2005.

ALVES, L. C.; CAMMAROTA, M. C.; FRANÇA, F. P. Inibição de lodo biológico anaeróbio por constituintes de efluente de laboratório de controle de poluição. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 236-242, 2005.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, 1968.

ATTENSION TENSIO METERS - BIOLIN SCIENTIFIC AB (Publ) – Critical micelle concentration. Disponível em: <http://www.attension.com/critical-micelle-concentration>. Acesso em: 23/03/2012.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F. DOS.; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: Causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BARROS, F. F. C. **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008a.

BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 35, p. 1071-1078, 2008b.

BUSTAMANTE, M.; DURÁN, N.; DIEZ, M. C. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, n. 12, v.4, p. 667-687, 2012.

CAMEOTRA; S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin/Heidelberg, v. 50, p-520-529, 1998.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p. 262-266, 2004.

CARVALHO, F. M. DE.; SANTOS, A.; VIANA, A. E. S.; LOPES, S. C.; EGLER, P. G. Avaliação da atividade poluidora da manipueira na bacia do rio Santa Rita, em Vitória da Conquista, Bahia. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 2005, Campo Grande. **Anais eletrônicos...** Botucatu: SBM. Disponível em: <http://www.cpa0.embrapa.br/11cbm/_html/trabalhos/arquivoPDF/pasta62.PDF>. Acesso em: 26/05/2012.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Volume 5**. 10ª Ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG. Belo Horizonte. 1997.

CHRISTÉ, R. C.; COHEN, K. de O.; OLIVEIRA, S. S. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 437, 440, Campinas, 2007.

COOPER D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Rhamnolipídeos e Polihidroxialcanoatos (PHAs)**. 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1511-1516, 2010.

CRUZ, M. **Toxicidade da manipueira ainda sem controle ameaça peixes**. Gente de Opinião, Porto Velho, Set. 2009. Disponível em: <<http://www.gentedeopinioao.com.br/lerConteudo.php?news=50041>>. Acesso em: 26/05/2012.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DAMASCENO, F. R. C. **Aplicação de preparado enzimático e biossurfactante no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura**. 2013. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Pretreatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 720-728, 2011.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, 1956.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson**. Brasília. 2013. Comunicado Técnico 86.

FARIAS, A. R. N.; FERREIRA FILHO, J. R.; MATTOS, P. L. P. DE. Manipueira e plantas armadilhas no controle de formigas cortadeiras na cultura da mandioca. **EMBRAPA. Mandioca em foco**, Cruz das Almas, 1ª Ed. n. 32, Out. 2006. Disponível em:

<http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/mandioca_32.pdf>. Acesso em: 26/05/2012.

FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju**. 2012. 103p. Dissertação. (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2012.

FLORENTINO, H. O.; BISCARO, A. F. V.; PASSOS, J. R. S. Funções sigmoidais aplicadas na determinação da atividade metanogênica específica - AME. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 141-150, 2010.

ISLAS, D. J.; MORENO, M.; RODRÍGUEZ, J. N. G. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, Coyoacán, v. 26, n. 1, p. 68-84, 2010.

KRONEMBERGER, F. A. **Produção de ramnolípídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. 2007. 153p. Tese (Programa de Pós-Graduação de Engenharia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.

KRONEMBERGER, F. A.; SANTA ANNA, L. M.; FERNANDES, A. C. L.; MENEZES, R. R. M.; BORGES, C. P.; FREIRE, D. M. G. Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, n.1-3, p. 33-45, 2008.

LIMA, T. M. S.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDÃO, F. D.; CARVALHO, A. M. X.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v. 22, p. 585-592. 2011.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains and thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45 °C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, n. 3, p. 367-371, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strains of *Bacillus subtilis* at 45 °C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 5, n. 1, p. 11-17, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 5, p.1-19, 2011.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 295-301, 2003.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 81-85, 2004.

- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, p. 163-171, 2004.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.
- PETRUY, R.; LETTINGA, G. Digestion of a milk-fat emulsion. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 141-149, 1997.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.
- PIRRÔLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Rio Claro, SP, 2006.
- POETSCH, P.; KOETZ, P. R. Sistema de determinação da atividade metanogênica específica de lodos anaeróbios. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 161-165, 1998.
- QUADROS, C. P.; DUARTE, M. C. T.; PASTORE, G. M. Biological activities of a mixture of biosurfactant from *Bacillus subtilis* and alkaline lipase from *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, p. 354-361, 2011.
- RESGALLA Jr, C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. **Notas Técnicas FACIMAR**, Itajaí, v. 6, p. 153-163, 2002.
- RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 528-521, 2009.
- ROMANELLI, M. F. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes DSS e LAS submetidos à irradiação com feixes de elétrons**. 2004. 156 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências – área de Tecnologia Nuclear – aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ROCHA, M. A. G. et al. Avaliação e comparação entre a atividade metanogênica específica de lodos de esgotos doméstico e industriais. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Anais...** João Pessoa, 2001.
- ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Tensioativos: uma abordagem básica e perspectiva para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, v. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2006.
- SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, p. GEBJ-29, 2011.
- SANTOS, L. C.; MILLIOLI, V. S. Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. In: XI JORNADA DE INICIAÇÃO

CIENTÍFICA CETEM, 2003, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XI_jic_2003/16_Leticia_Cotia_JIC_2003.pdf>. Acesso em: 01/09/2012.

SANTOS, F. P. B. dos. **Produção de Biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ109 a Partir de Glicerol**. 2011. 122f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

SARACHAT, T.; PORNUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 324-330, 2010.

SILVA, J. N.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Application of home-made enzyme and biosurfactant in the anaerobic treatment of effluent with high fat content. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 3, n. 3, 2013.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110-116, 1987.

SINGH, A., VAN HAMME, J. D., WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**. n. 25, p. 99-121, 2007.

SLIVINSKI, C. T. **Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SOBRINHO, H. B. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biosurfactante por *Candida sphaerica***. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

VALLADÃO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, p. 219-225, 2007.

CAPÍTULO 2 – PRÉ-TRATAMENTO DE ELUENTE DE ABATEDOURO DE AVES COM SURFACTINA PRODUZIDA EM MANIPUEIRA

RESUMO

Efluentes agroindustriais, como o proveniente do abatedouro de aves, apresentam como característica elevada carga orgânica e a presença de Óleos e Graxas (OG). Os OG podem ocasionar sérios problemas no sistema de tratamento, pois as gorduras apresentam baixa taxa de degradação e se acumulam no sistema. Nesse sentido, há a necessidade de uma etapa de pré-tratamento antes de encaminhá-lo ao tratamento biológico. A aplicação de metabólitos microbianos no pré-tratamento de efluentes é uma alternativa ambientalmente mais branda e economicamente mais viável. Os biossurfactantes são substâncias produzidas por seres vivos que promovem a emulsificação das moléculas de gordura, e tornam-nas mais biodisponíveis à degradação microbiana, conseqüentemente permitem que não haja a necessidade da utilização de pré-tratamento físico-químico para separar a gordura do efluente líquido. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a aplicação do biossurfactante surfactina produzido por *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira na etapa de pré-tratamento do efluente de abatedouro de aves. Verificou-se, a partir de diferentes concentrações de surfactina em extrato bruto (6; 13,27; 31; 48,73; e 56 mg.L⁻¹) e temperaturas (25; 30; 42,5; 55 e 60 °C) a solubilização da matéria orgânica presente durante o período de incubação de 6 horas, nas condições de 150 rpm e volume útil de 150 mL para cada composição. A solubilização da matéria orgânica foi obtida por avaliação da Demanda Química de Oxigênio solúvel (DQOs) de acordo com a metodologia de APHA et al. (2005). Os dados foram processados com o *software* Statistica com o planejamento do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que consistiu de fatorial 2ⁿ, com três repetições no ponto central e dois pontos sobre o eixo de cada variável n, a uma distância $\pm \alpha$ do ponto central (pontos axiais), com um total de 11 ensaios. A caracterização do efluente de abatedouro de aves da agroindústria demonstrou que os valores obtidos para os parâmetros são semelhantes aos reportados na literatura. Entretanto, a concentração de OG neste efluente (535,33 mg.L⁻¹) é reduzida em comparação com outros trabalhos, o que permite destacar a eficiência do sistema atual de operação da agroindústria, além da vazão de água utilizada no processo que promove a diluição deste componente. Durante os ensaios de pré-tratamento, observou-se que o tempo de 4,5 horas foi suficiente para solubilizar a DQO em sua máxima concentração, e que nas maiores temperaturas e concentrações de surfactina (acima da sua CMC) encontraram-se os maiores valores de aumento da solubilização da DQO, porém, na prática, é inviável o aquecimento do efluente para realizar o pré-tratamento.

PALAVRAS-CHAVE: Biossurfactante, solubilização da matéria orgânica, efluente agroindustrial.

CHAPTER 2 – PRETREATMENT OF POULTRY SLAUGHTERHOUSE WASTEWATER USING SURFACTIN PRODUCED IN CASSAVA WASTEWATER

ABSTRACT

Agroindustrial effluents, such as the one that comes from poultry slaughterhouse, have high organic load as well as oils and greases (OG). The OG can cause serious problems during the treatment system, since fats have low degradation rate and accumulate in the system. Thus, it is important to have a pretreatment phase before forwarding it to the biological treatment. The application of microbial metabolites in the pretreatment effluent is a milder alternative environmentally and economically feasible. Biosurfactants are substances produced by living organisms that promote emulsification of fat molecules and make them more bioavailable to microbial degradation, consequently, they help on not using physico-chemical pretreatment to separate fat from the liquid effluent. So, this research aimed at evaluating the application of surfactin biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LB5a in cassava during the pretreatment phase of poultry slaughterhouse wastewater. It has been observed that from several surfactin concentrations of crude extract (6; 13.27; 31; 48.73; and 56 mg.L⁻¹) and temperatures (25, 30, 42.5, 55 and 60 °C) that there was organic matter solubilization presence during a six-hour incubation under 150 rpm conditions and 150 mL working volume for each composition. The solubilization of organic matter was obtained by evaluation of soluble chemical oxygen demand (SCOD) according to APHA et al. (2005) methodology. Data were analyzed with Statistica software with planning of Central Composite Rotational Design (CCRD), which consisted of a 2ⁿ factorial design with three replications at the central point and two points on the axis of each n variable at a ± α distance from the central point (axial points), with a total of 11 trials. The characterization of poultry slaughterhouse wastewater from agribusiness showed that the obtained values for the parameters are similar to those ones reported in the literature. However, the concentration of OG in this effluent (535.33 mg L⁻¹) is reduced when compared to other trials, allowing highlight the efficiency of the current system on operating agribusiness, as well as water used in the process flow that promotes dilution of such component. During the pretreatment assays, it was observed that the 4.5-hour time was enough to solubilize COD concentration at its maximum, and at the highest temperatures and surfactin concentrations (above its CMC), it could be recorded the highest answers of solubilization increase of COD, however, in practice, it is infeasible heating the effluent to carry out the pretreatment.

KEYWORDS: Biosurfactant, solubilization of organic matter, agro-industrial effluent.

2.1 INTRODUÇÃO

A água, essencial para o processo de abate e preparação das carcaças de frango, compõe o efluente gerado em grande volume nas agroindústrias. Além da presença de outras substâncias orgânicas, no efluente está presente a gordura animal ou os óleos e graxas (OG) que não são facilmente biodegradáveis e, frequentemente, interferem no processo normal de tratamento biológico do efluente.

Esses OGs são triglicerídeos, que consistem de ácidos graxos de cadeia longa, que, por sua vez, podem ocasionar toxidez aos microrganismos, problemas operacionais na planta de tratamento, tais como: produção de lodo com baixa atividade metanogênica específica, aumento na formação de espuma, flotação da biomassa e entupimento dos dutos.

Dessa forma, é essencial realizar o pré-tratamento a fim de remover OG e aprimorar a eficiência do tratamento biológico subsequente, geralmente utilizado pelas agroindústrias. Um grande número de métodos de pré-tratamento é empregado para remover OG de efluentes tais como o físico-químico, uso de substâncias químicas (sulfato de alumínio e cloreto férrico) e flotação por ar dissolvido.

Atualmente, existem pesquisas sobre a aplicação de metabólitos microbianos como enzimas e surfactantes no pré-tratamento de efluentes que contenham OG, os quais visam à maior eficiência, diminuição nos custos de tratamento, redução de impactos ambientais, menor geração de resíduos e contaminantes. O uso de surfactantes no pré-tratamento de efluentes com OG pode facilitar a biodegradação desses componentes pelo aumento da solubilidade.

Os surfactantes produzidos via biológica (biossurfactantes) podem emulsionar triglicerídeos e isso facilita a ação de enzimas e o processo de biodegradação, além de eliminar a necessidade de processos adicionais de pré-tratamento tais como a utilização de um flotador.

O biossurfactante surfactina é proveniente do metabolismo da bactéria *Bacillus subtilis* LB5a e, quando obtido por meio do cultivo do microrganismo em meio de cultura de baixo custo, torna a produção mais vantajosa. A manipueira é um efluente rico em nutrientes proveniente do processamento das raízes da mandioca, e, nos últimos tempos, é objeto de pesquisa para ser utilizada como meio de crescimento aos microrganismos produtores de biossurfactante, com a vantagem de não necessitar de complementação nutricional.

Nesse sentido, o presente trabalho avaliou os ensaios de pré-tratamento de um efluente de abatedouro de aves com OG, com a surfactina obtida do cultivo de *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira. Avaliaram-se ainda as diferentes concentrações do biossurfactante e o efeito da temperatura na solubilização da matéria orgânica.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar o pré-tratamento do efluente de abatedouro de aves com o biossurfactante surfactina produzido em manipueira.

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da dosagem de surfactina e da temperatura na solubilização da matéria orgânica do efluente;
- Verificar o tempo necessário de pré-tratamento para que ocorra a maior solubilização da matéria orgânica do efluente.

2.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.3.1 Características do efluente de abatedouro de aves

A agroindústria processadora de aves é muito desenvolvida e de relevada importância econômica no Estado do Paraná, uma vez que, no primeiro trimestre de 2014, foi registrado o abate de 382,9 milhões de cabeças de frango. As exportações são o principal incentivo para o crescimento da produção bem como o aumento do consumo dessa carne pelos brasileiros nos últimos anos (SINDIAVIPAR, 2014).

Associada à importância econômica da atividade estão os aspectos e impactos ambientais resultantes, os quais estão relacionados com o elevado consumo de água durante as várias etapas do processo de abate e a consequente geração de efluentes (Dallago et al., 2012) bem como as condições cada vez mais limitantes para seu descarte final.

A quantidade de água utilizada no abate e processamento de um frango de corte varia muito dentre as agroindústrias, e é função direta da capacidade de abate (Moraes; Paula Junior, 1999), mas situa-se na faixa de 19 a 38 litros por ave (KIEPER; MERKA; FLETCHER, 2008).

Damasceno et al. (2009) e Formentini et al. (2010) realizaram estudos em abatedouros de aves, localizados na região Sul do Brasil com 450.000 e 130.000 aves abatidas por dia, respectivamente, e observaram o consumo médio de 21 e 26 litros de água por ave abatida.

Durante o processamento das aves, os efluentes são gerados na seção de sangria, de depenamento, evisceração e preparação da carcaça. Além desses, há os efluentes oriundos do serviço de manutenção realizada, como a lavagem do piso e dos equipamentos (MORAES; PAULA JUNIOR, 1999).

O fluxograma do processamento de aves em um abatedouro é constituído das seguintes etapas (Figura 19):

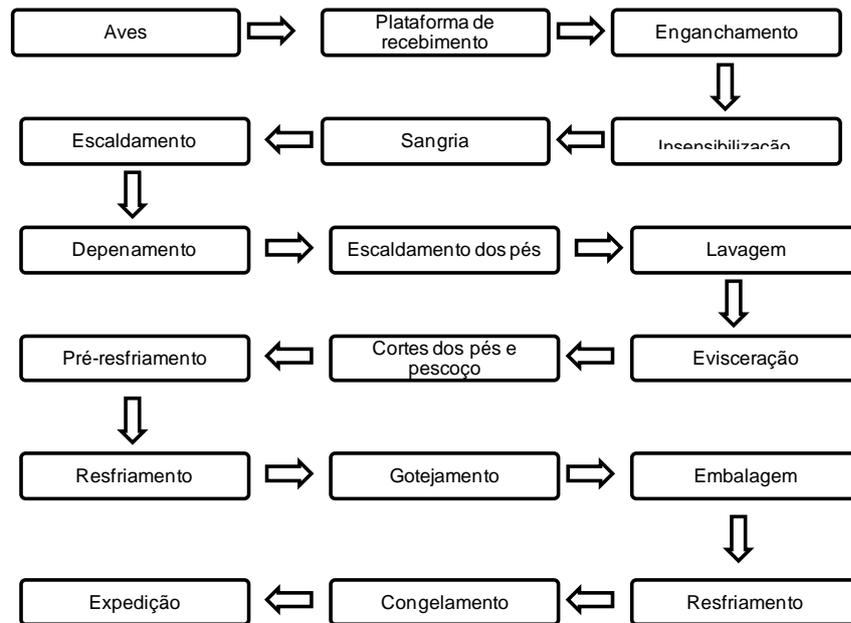


Figura 19 Fluxograma do processamento de aves em um abatedouro.
Fonte: Moraes e Paula Junior (1999).

A composição do efluente bruto gerado nesse tipo de agroindústria apresenta como característica principal a elevada carga orgânica. Na Tabela 10 é apresentada a caracterização de tal efluente de acordo com diversos autores.

Tabela 10 Caracterização do efluente bruto de abatedouro de aves segundo diversos autores.

Parâmetros	Autores				
	Moraes e Paula Junior (1999)	Cikoski et al. (2008)	Kist, Moutaqi e Machado (2009)	Damasceno et al. (2009)	Damasceno, Cammarota e Freire (2012)
pH	6,5	5,6	-	6,4	6,4
DQO	1015	1100	2440	7264	8692
Nitrogênio Total	-	-	78 a 456	200	434
Fósforo Total	-	-	6 a 14	70	6,5
Sólidos Totais	927	-	-	4508	6717
Óleos e graxas	454	530	71 a 448	2900	2403

*Todos os parâmetros, exceto pH, estão expressos em mg.L⁻¹.

As variações observadas nas características do efluente estão diretamente relacionadas com a eficiência de recuperação de subprodutos no processo. Por exemplo, o efluente gerado na seção de sangria constitui-se basicamente de sangue, que é passível de comercialização. Entretanto, quando o sangue não é reaproveitado, a elevação dos valores de DQO no efluente final é considerável (MORAES; PAULA JUNIOR, 1999).

Conforme observado na Tabela 10, os efluentes provenientes de abatedouro de aves contêm altas quantidades de lipídeos que apresentam baixa biodegradabilidade. A fração de lipídeos é caracterizada por óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos, que é um dos componentes mais importantes presentes nas águas residuárias de indústrias de alimentos

bem como constituinte da maior parte da matéria orgânica presente em águas residuárias de esgotos domésticos (RAUNJKAER; HVITVED-JACOBSEN; NIELSEN, 1994; MENDES et al., 2005; CHIPASA; MEDRZYCKA, 2006).

A fração lipídica presente nos efluentes causa problemas operacionais ao sistema de tratamento, dentre os quais estão: limitação à transferência de gases necessários à degradação biológica, especialmente ao reduzir a transferência de oxigênio, o entupimento em reatores, flotação da biomassa em reatores com leitos granulares e a inexistência das fases de metanogênese e acetogênese. Isso ocorre devido à presença de intermediários a partir da degradação de lipídeos, os ácidos graxos de cadeia longa (CAMMAROTA; FREIRE; 2006; CIRNE et al., 2007; GOMES et al., 2011).

Todos esses problemas limitam a eficiência de operação de lagoas, reatores ou digestores, os quais para contornarem a problemática e permitirem que o tratamento biológico seja desenvolvido sem qualquer inibição do material orgânico presente no efluente, um pré-tratamento físico-químico é geralmente aplicado a fim de remover a fração lipídica antes do tratamento biológico anaeróbio (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; CIRNE et al., 2007).

O tratamento físico-químico para efluentes agroindustriais ricos em lipídeos reduz a carga orgânica pela precipitação ou flotação de proteínas e gorduras com a adição de diferentes compostos, como sulfato de alumínio, cloreto férrico ou cal, que são utilizados para quebrar a emulsão e coagular as partículas de gordura, as quais podem então ser separadas por flotação ou sedimentação (WILLEY, 2001). Entretanto, os reagentes químicos empregados são de custos elevados, a remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e das gorduras emulsionadas é reduzida e o lodo produzido é de difícil descarte (VIDAL et al., 2000; LUCAS; KOETZ; PRZYBYLSK, 2000).

A geração de efluentes com as características observadas é de grande preocupação para as agroindústrias, pois a sustentabilidade é um fator relevante para o crescimento e desenvolvimento da atividade avícola. Dessa maneira, os efluentes industriais provenientes de laticínios, abatedouros, de enlatados e extração de óleos têm motivado a realização de pesquisas que buscam reduzir o impacto ambiental e enquadrar a indústria nos padrões vigentes de lançamento de efluentes (MENDES et al., 2005).

O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) publicou a Resolução nº 430 em 13 de maio de 2011, que trata das condições, parâmetros, padrões e diretrizes para a gestão do lançamento de efluentes em corpos d'água receptores. Esta Resolução altera as Resoluções anteriores do mesmo órgão e determina que efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e seguir as novas orientações legais (BRASIL, 2011).

Em seu Art. 16 (BRASIL, 2011), a supracitada Resolução CONAMA descreve que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo

receptor se obedecerem às condições e aos padrões previstos nesse artigo (Tabela 11), resguardadas outras exigências cabíveis.

Tabela 11 Condições de lançamentos de efluentes de acordo com a Resolução nº 430/2011 do CONAMA.

Parâmetros	Padrão de lançamento
pH	5 a 9
Temperatura	Inferior a 40 °C
Materiais sedimentáveis	Até 1mL.L ⁻¹
Regime de lançamento	Vazão máxima de 1,5 vez a vazão média do período de atividade diária
Óleos e graxas	Óleos minerais: até 20 mg.L ⁻¹ ; Óleos vegetais e gorduras animais: até 50 mg.L ⁻¹
DBO _{5,20}	Remoção mínima de 60% de DBO
Materiais flutuantes	Ausência

* DBO_{5,20} = Demanda Bioquímica de Oxigênio por 5 dias a 20 °C.

Dessa maneira, os efluentes gerados em agroindústrias necessitam passar por sistema de tratamento que permita a diminuição da sua carga, para que a atividade se enquadre na legislação e não promova a alteração da qualidade dos recursos hídricos.

O tratamento de efluentes pode ser realizado por via físico-química ou biológica. A escolha do processo leva em conta o tipo de efluente a tratar, a biodegradabilidade, a presença de toxinas, a produção de lodos, dentre outros fatores (MOTTA et al., 2003). Os investimentos em capital, os custos operacionais, a área disponível para implantação do tratamento, o controle operacional e a legislação ambiental devem ser também considerados (BNDES, 1997).

Devido ao menor custo de funcionamento e simplicidade operacional, os processos biológicos são, em geral, escolhidos para o tratamento de efluentes urbanos e de muitos tipos de efluentes agroindustriais (MOTTA et al., 2003).

O tratamento biológico tem por objetivo a remoção da matéria-orgânica (carboidratos, proteínas e lipídeos) do efluente, pela transformação em biomassa e gases, medidos como Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a DQO. (VON SPERLING, 1996). Os processos biológicos de tratamento de efluente dividem-se em aeróbios e anaeróbios, e estes últimos são selecionados quando os efluentes apresentam elevadas cargas orgânicas biodegradáveis, como os de indústrias de abate de aves (NARDI, et al., 2011).

2.3.2 Aplicação de metabólitos microbianos no pré-tratamento de efluentes com elevados teores de lipídeos

Um grande número de sistemas de pré-tratamento tem sido empregado para hidrolisar e dissolver gorduras das águas residuárias, a fim de evitar uma série de problemas que podem surgir no processo biológico e reduzir a eficiência do tratamento.

A utilização de enzimas microbianas no pré-tratamento de efluentes com elevados teores de gordura é, sem dúvida, a área de aplicação mais estudada, atualmente. Nessa área, encontram-se pesquisas que envolvem os mais diversos tipos de efluentes, tais como efluente de indústria do pescado (Valente et al., 2010), efluente de laticínio (Rosa et Al., 2009; Mendes; Pereira; Castro, 2006; Leal et Al., 2002; Cammarota; Teixeira; Freire, 2001), efluente de abatedouro de aves (Valladão; Freire; Cammarota, 2007); efluente de abatedouro de suínos (MASSE; MASSÉ; KENNEDY, 2003).

Oliveira et al., (2011) avaliaram o processo de biodigestão anaeróbia no tratamento de efluente de abatedouro de aves com diferentes tempos de retenção hidráulica e concentrações da enzima pancreatina. Os autores concluíram que o pré-tratamento com a adição de lipase foi eficiente para aumentar a produção de biogás e metano bem como para levar a aumento na remoção de material orgânico, em biodigestores semicontínuos alimentados com efluente de abatedouro de aves.

Resultados semelhantes foram obtidos por Qamsari et al. (2012), que avaliaram a pré-hidrólise enzimática de efluente de laticínio com lipase produzida por *Pseudomonas aeruginosa*. Esse pré-tratamento à digestão anaeróbia melhorou a degradação biológica da gordura, que estava com concentração de 1000 mg.L¹, acelerou o processo, produziu maior quantidade de biogás e reduziu o tempo de biodigestão.

De acordo com Gallert; Winter (2005), no tratamento de efluentes com elevadas quantidades de gorduras, a máxima atividade hidrolítica proporcionada pelas lipases e fosfolipases é alcançada quando a fração lipídica é emulsificada.

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersa como gotículas microscópicas em outra fase líquida, geralmente água (DESAI; BANAT, 1997). O elevado peso molecular dos biossurfactantes, os quais também são produtos do metabolismo microbiano, os torna eficientes agentes emulsificantes e permite que eles sejam aplicados como aditivo para estimular a biorremediação e remoção de substâncias gordurosas do ambiente (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). A capacidade de formar e estabilizar emulsões é uma das características mais importantes a serem considerados para a aplicação prática de um surfactante (COSTA et al., 2010).

A realização da etapa de pré-tratamento de efluentes com biossurfactantes tem como objetivo emulsionar as partículas de gordura presentes, para que esse componente

esteja mais biologicamente disponível e, assim, aumente sua biodegradação e acelere o processo de tratamento (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

Diversos pesquisadores, dentre os quais podem ser citados Petruy e Lettinga (1997), Nitschke e Pastore (2002), Nakhla et al. (2003), Kumar et al. (2008), Kumar; Kalil e Costa (2008), Daverey e Pakshirajan (2011), Damasceno; Cammarota e Freire (2012), entre outros, estudam a utilização de biossurfactantes no tratamento de água e solo contaminados por gorduras, petróleo e seus derivados.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Origem, coleta e caracterização do efluente de abatedouro de aves

O efluente utilizado no trabalho foi obtido de um abatedouro de aves, localizado no município de Cascavel – PR, que abate em média, 140 mil cabeças de frangos por dia. A água utilizada nessa agroindústria é proveniente de poço semiartesiano e não recebe adição de produtos químicos.

O efluente bruto foi coletado na entrada do tanque de equalização durante o período de abate (Figura 20), ou seja, o efluente já havia passado pela etapa de peneiramento, onde os constituintes maiores, como os resíduos de pele, ficam retidos. Não foi coletado efluente durante o período de higienização dos equipamentos para que não fossem obtidas amostras que contivessem produtos químicos utilizados na limpeza, os quais poderiam interferir nos ensaios posteriores de biodigestão anaeróbia.



Figura 20 Local de coleta do efluente de abatedouro de aves.

No total foram realizadas quatro coletas do efluente, as quais foram apropriadamente armazenadas conforme a NBR 9898, (ABNT, 1987). Alíquotas foram retiradas para caracterização dos parâmetros físicos e químicos e o restante foi armazenado e congelado. As análises de caracterização do efluente foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental da UNIOESTE (Tabela 12).

Tabela 12 Parâmetros e metodologias de análise para caracterização do efluente bruto de abatedouro de aves.

Parâmetros	Metodologia	Métodos
Alcalinidade Total (AT) (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	2320 B
Acidez (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	2310 B
Cálcio (mg.L ⁻¹)		Digestão nitroperclórica
Cor (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	2130 B
Carbono Orgânico Total (COT)	Analizador TOC	Combustão catalítica

Tabela 12 (continuação) Parâmetros e metodologias de análise para caracterização do efluente bruto de abatedouro de aves.

Parâmetros	Metodologia	Métodos
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	5220 D
Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQOS) (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	5220 E
Fósforo (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	4500 P E
Magnésio (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	Digestão nitroperclórica
Manganês (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	Digestão nitroperclórica
Nitrato (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	Análise por injeção em fluxo 4500-NO ₃ ⁻
Nitrito (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	Análise por injeção em fluxo 4500-NO ₂ ⁻
Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	APHA (2005)	4500-NH ₃ C
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	4500-NorgC Semi-micro Kjeldahl
Óleos e Graxas (OG) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	5520 D
pH	APHA et al. (2005)	4500 H
Sódio (mg.L ⁻¹)		Digestão nitroperclórica
Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	2540 C
Sólidos Dissolvidos Fixos (SDF) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	2540 C
Sólidos Dissolvidos Voláteis (SDV) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	2540 C
Sólidos Totais (ST) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	2540 B
Sólidos Totais Fixos (STF) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	2540 B
Sólidos Totais Voláteis (STV) (mg.L ⁻¹)	APHA et al. (2005)	2540 B
Temperatura (°C)	APHA et al. (2005)	2550 B
Turbidez (UNT)	APHA et al. (2005)	2130 B

2.4.2 Pré-tratamento do efluente com o biossurfactante surfactina

Durante o pré-tratamento foi avaliada a capacidade da surfactina em emulsionar a fração lipídica e assim promover o aumento da solubilização da matéria orgânica presente no efluente. Para se observar a influência das variáveis temperatura e concentração de biossurfactante sobre o aumento da DQO solúvel (DQOs), foi escolhido o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Tal planejamento consistiu de um fatorial 2ⁿ, com três repetições no ponto central e dois pontos sobre o eixo de cada variável n, a uma distância ± α do ponto central (pontos axiais). Os valores máximos e mínimos são representados por +1 e -1, respectivamente e o ponto central por 0 (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do *software* Statística 8.

As condições em que os ensaios de pré-tratamento foram conduzidos são apresentadas na Tabela 13, e as concentrações de surfactina aplicadas foram baseadas em dados da literatura.

Tabela 13 Valores reais e codificados das variáveis: concentração de biossurfactante (BS) e temperatura (T).

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
BS (mg.L ⁻¹)	6	13,27	31	48,73	56
T (°C)	25	30	42,5	55	60

BS = concentração do biossurfactante, T = temperatura.

Os ensaios preliminares de pré-tratamento foram conduzidos em Béqueres de vidro de 250 mL, continham 140 mL do meio constituído de efluente bruto e 10 mL do meio constituído de surfactina nas suas diferentes concentrações, cujo total foi de 150 mL de volume útil. Em uma incubadora refrigerada com agitação (TECNAL Modelo TE422) fixou-se a agitação de 150 rpm por até 6 horas, e foram retiradas alíquotas para análise em intervalos fixos de 1,5 h (DAMASCENO, 2013).

Com os resultados obtidos, foi possível observar a solubilização da matéria orgânica no decorrer do tempo de incubação e a temperatura mais adequada. Utilizou-se o valor máximo de DQO solúvel (DQOs) como variável resposta para a análise estatística de variância (ANOVA) e essa foi quantificada de acordo com a metodologia descrita em APHA et al. (2005).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Caracterização do efluente de abatedouro de aves

Durante o período de estudo foram realizadas quatro campanhas de coleta do efluente bruto de abatedouro de aves na agroindústria localizada em Cascavel-PR entre os anos de 2012 e 2014. A caracterização de cada coleta é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14 Parâmetros de caracterização e resultados médios obtidos.

Parâmetros	Campanhas de coleta				Valores médios
	1	2	3	4	
	Resultados				
Alcalinidade Total (AT) (mg.L ⁻¹)	151	148	157	185	160
Acidez Volátil (mg.L ⁻¹)	108	107	127	243	146
Cálcio (mg.L ⁻¹)	4,85	4,80	--	--	4,82
Cor (mg.L ⁻¹)	--	--	54	47	51
Carbono Orgânico Total (COT)	--	284	--	--	284
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg.L ⁻¹)	1856	1490	1773	2360	1870
Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQO _s) (mg.L ⁻¹)	--	--	607	590	599
Fósforo (mg.L ⁻¹)	8,26	8,20	--	--	8,23
Magnésio (mg.L ⁻¹)	3,34	3,30	--	--	3,32
Manganês (mg.L ⁻¹)	AL	AL	--	--	AL
Nitrato (mg.L ⁻¹)	AL	AL	--	--	AL
Nitrito (mg.L ⁻¹)	AL	AL	--	--	AL
Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	7,05	6,65	10,08	--	7,92
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) (mg.L ⁻¹)	112	90	136	--	112
Óleos e Graxas (OG) (mg.L ⁻¹)	617	631	669	535	613
pH	6,80	7,13	6,37	6,80	6,78
Sódio (mg.L ⁻¹)	50	50	--	--	50
Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) (mg.L ⁻¹)	--	--	--	515	515
Sólidos Dissolvidos Fixos (SDF) (mg.L ⁻¹)	--	--	--	217	217
Sólidos Dissolvidos Voláteis (SDV) (mg.L ⁻¹)	--	-	--	297,50	297,50
Sólidos Totais (ST) (mg.L ⁻¹)	--	1366	1356	1594	1439
Sólidos Totais Fixos (STF) (mg.L ⁻¹)	--	449	303	208	320
Sólidos Totais Voláteis (STV) (mg.L ⁻¹)	--	916	1053	1386	1118
Temperatura (°C)	23	23	28	23	24
Turbidez (UNT)	--	309	563	180	351

AL = abaixo do limite de detecção.

A vazão média de efluente gerado pelo abatedouro de aves onde foram coletadas as amostras para a realização deste trabalho é de 180 m³.h⁻¹. Damasceno et al. (2009)

obtiveram vazão de $298,67 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ para um abatedouro de aves localizado no estado de Santa Catarina, onde se utiliza em média, 21 litros de água por ave abatida.

Conforme observado na Tabela 11, a Alcalinidade Total (AT) variou de 148,25 a 185,25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, com média de 160,32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A Acidez volátil (AV) variou de 106,80 a 243,63 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, com média de 146,44. A relação AV/AT média obtida foi de 0,91.

A DQO total observada durante as coletas variou de 1489,91 a 2360,49 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ com média de 1870,07 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A DQO solúvel realizada nas amostras coletadas nas campanhas de 2013 e 2014 variou de 590,30 a 607,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ com valor médio de 598,70 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, tal dado representa aproximadamente 32% da DQO total.

O resultado médio obtido em duas coletas para o parâmetro fósforo total foi de 8,23 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, e o resultado médio obtido para o nitrogênio total kjeldahl (NTK) foi de 112,88 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

O pH observado nas quatro campanhas de coleta manteve na faixa de 6,80 a 7,13, com valor médio de 6,78, o qual, segundo Chernicharo (1997), situa-se dentro da faixa ideal para o crescimento das bactérias metanogênicas (6,6 a 7,4) e conseqüente sucesso do tratamento anaeróbio.

Os ST presentes no efluente apresentaram valor médio de 1439,03 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e os ST voláteis (STV) média de 1118,59; portanto, é possível demonstrar a característica predominantemente orgânica do resíduo, o qual é passível de tratamento biológico.

No trabalho de Oliveira et al. (2011), avaliou-se a biodigestão anaeróbia no tratamento de efluente de abatedouro avícola e caracterização do efluente com os seguintes valores médios: DQO: 2490,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, N-amoniaco: 86,8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH: 6,9, fósforo total: 3,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ST: 1500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e SV: 1290 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Com o mesmo objetivo, Damasceno (2013) apresenta em seu trabalho a seguinte caracterização deste tipo de efluente (valores médios): DQO total: 25028 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, DQO solúvel: 18404 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, SDT: 2451 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, OG: 3904 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH: 6,11 e fósforo total: 6,56 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Caldera et al. (2010), ao avaliarem o sistema de tratamento de efluente avícola em uma agroindústria venezuelana, obtiveram os seguintes resultados médios na caracterização do efluente bruto: DQO solúvel: 1584,23 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, OG: 413,47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NTK: 109,94 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, fósforo total: 9,60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e alcalinidade total: 213,81 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Silva et al. (2013) obtiveram a seguinte caracterização do efluente de abatedouro de aves a ser avaliado em biodigestão anaeróbia pós e pré-tratamento com enzima e biossurfactante: DQO: 8692 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, SVT: 4910 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NTK: 434 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e fósforo total: 6,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

O material gorduroso, quantificado em termos de óleos e graxas (OG), variou de 535,33 a 669,66 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, com média de 613,41 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, e isso corresponde aproximadamente a 32% da DQO total e a 42% dos sólidos totais (ST) do efluente.

Ao realizar-se um comparativo entre os resultados obtidos nesse trabalho pelos obtidos pelos supracitados autores, observa-se que, na maior parte, há concordância entre os valores médios obtidos nos parâmetros de caracterização avaliados. Ressalta-se, entretanto, conforme descrito por Damasceno (2013), que muitas características de efluentes agroindustriais diferem na literatura, pois esse tipo de efluente está sujeito aos procedimentos operacionais de cada indústria, inclusive em relação à minimização de resíduos e aos processos de tratamento de cada unidade.

2.5.2 Pré-tratamento do efluente com surfactina

Na Tabela 15, estão apresentados os valores do aumento da DQO solúvel nos tempos avaliados para cada condição aplicada nos ensaios de pré-tratamento do efluente com surfactina bem como a matriz codificada e real do planejamento.

Tabela 15 Matriz codificada e valores de DQO solúvel nos tempos avaliados, em resposta à temperatura e à concentração de biossurfactante.

Ensaio	Codificados		Real		DQO solúvel					Valor Máximo
	BS	T	BS	T	Tempo de incubação					
					0 h	1,5 h	3 h	4,5 h	6 h	
1	1	1	48,73	55	650	1048	1282	1429	1275	1429
2	1	-1	48,73	30	634	670	771	1135	1176	1176
3	-1	1	13,27	55	583	936	1144	1163	1197	1197
4	-1	-1	13,27	30	570	677	1087	723	1014	1087,47
5	0	1,41	31	60	553	944	1108	1190	1292	1292,33
6	0	-1,41	31	25	523	820	856	946	950	950,12
7	1,41	0	56	42,5	500	797	873	997	952	997,12
8	-1,41	0	6	42,5	410	636	747	771	728	771
9	0	0	31	42,5	886	986	1121	1005	780	1121
10	0	0	31	42,5	636	989	1087	1050	1039	1087
11	0	0	31	42,5	654	998	1087	1053	936	1087

BS = Biossurfactante Surfactina (mg.L^{-1}). T = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Observa-se que a DQO inicial (tempo 0 h) difere entre os tratamentos. Isso é devido à composição de cada tratamento, onde houve aplicação de diferentes concentrações do biossurfactante surfactina.

Na Figura 21, está ilustrado o aumento da DQO solúvel no decorrer do tempo para as diferentes condições aplicadas.

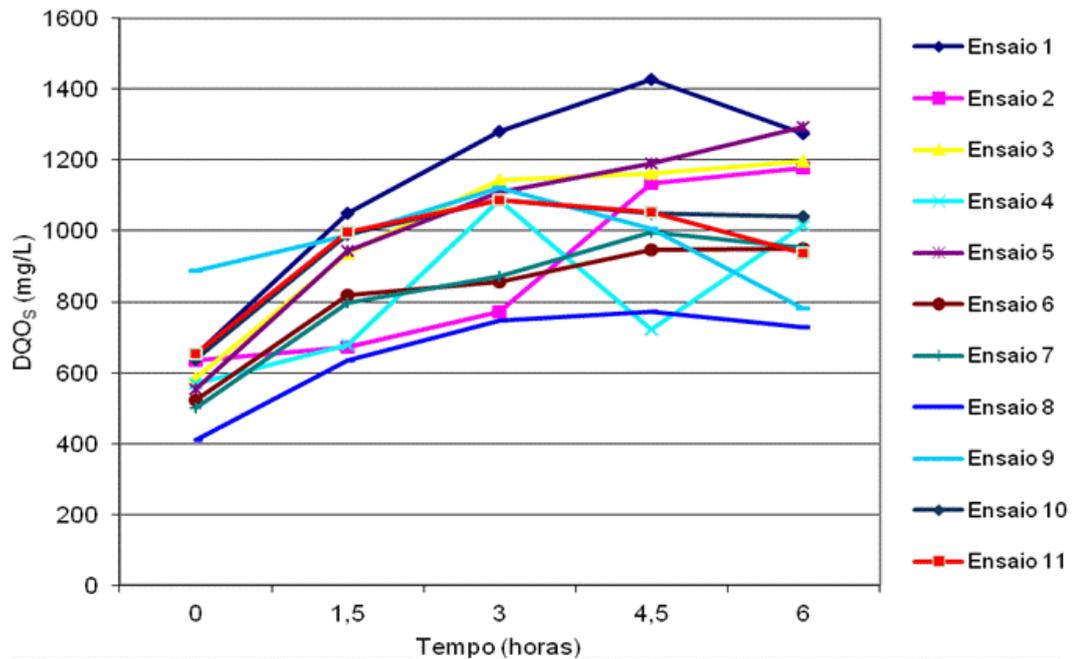


Figura 21 Aumento da DQO solúvel no decorrer do tempo, para as diferentes condições aplicadas nos ensaios.

Observou-se que, dentre os onze tratamentos aplicados no DCCR, dois ensaios apresentaram o valor máximo de solubilização de DQO em 4,5 horas de incubação. Oito ensaios apresentaram o valor máximo em outros tempos de incubação, mas com concentrações muito próximas às obtidas no tempo de 4,5 horas. A partir do exposto, observou-se que há tendência de aumento máximo de solubilização até 4,5 horas de incubação, exceto para o ensaio 4, que apresentou redução da solubilização nesse período. Foi realizada a repetição da análise laboratorial para a amostra e o resultado manteve-se na mesma tendência (diminuição da DQO solúvel em 4,5 horas).

Os autores Valladão, Freire e Cammarota (2009), Leal et al., (2006) e Rosa, Freire e Cammarota (2006) citam como melhor tempo de hidrólise (ação de enzimas sobre o efluente) para a solubilização da DQOs, um total de 4 horas. Para os biossurfactantes, o trabalho de Damasceno (2013) foi pioneiro em avaliar a ação conjunta de *pool* enzimático e biossurfactante do tipo ramnolípido sobre a solubilização da DQO presente em efluente de abatedouro de aves. A referida autora observou que o tempo de 4,5 horas é suficiente para promover tal resposta.

Nesse sentido, buscou-se trabalhar com o tempo máximo de 4,5 horas para o pré-tratamento do efluente, visto que, nos tratamentos em que houve aumento da solubilidade da DQO de 4,5 para 6 horas, esse aumento foi pouco significativo. Foi considerado também que, em alguns tratamentos, a DQO_s diminuiu nesse intervalo de tempo.

Após a análise estatística das respostas obtidas no tempo de 4,5 horas, foi possível verificar quais variáveis apresentaram efeito sobre o aumento da DQO solúvel. Essas respostas podem ser visualizadas na Figura 22 (gráficos de Pareto).

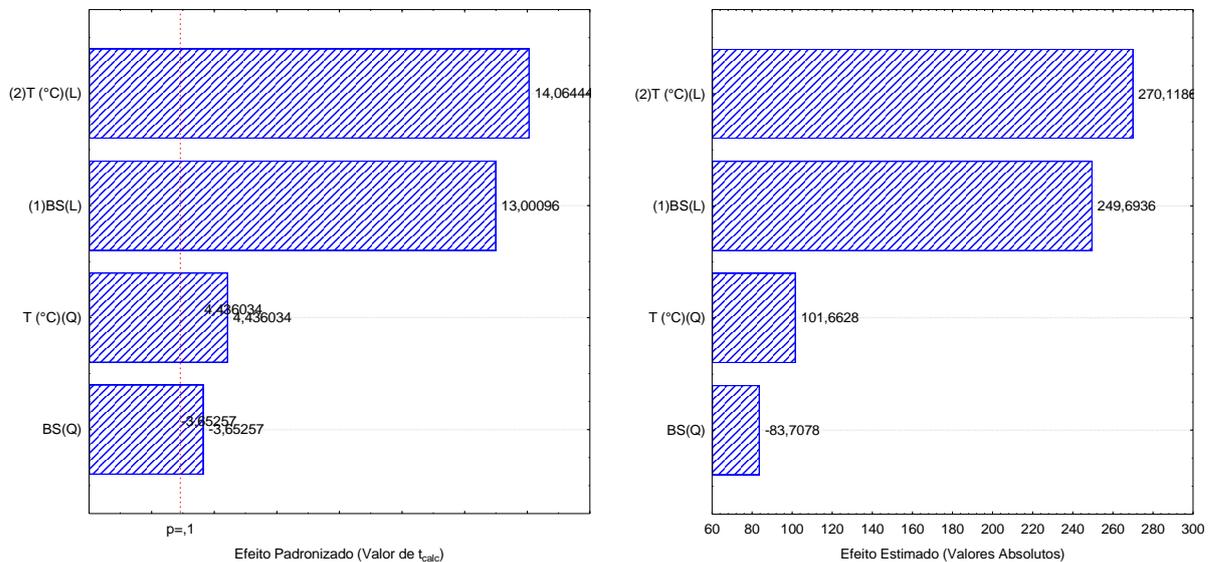


Figura 22 Efeitos padronizados e estimados para o aumento da DQO solúvel em 4,5 horas, com a concentração de biossurfactante e temperatura como variáveis independentes.

Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$).

A partir dos gráficos gerados, observa-se que as variáveis biossurfactante e temperatura, tanto na forma linear ou quadrática, apresentam efeito significativo sobre a variável resposta. O efeito da interação entre o biossurfactante e a temperatura foi excluído do modelo, pois não foi significativo. Esse resultado difere do obtido por Damasceno (2013), ao observar que a variável temperatura apresentou efeito positivo significativo sobre a variável resposta, tanto na forma linear quanto quadrática, mas também efeito significativo da interação entre biossurfactante e temperatura.

Silva et al. (2013) avaliaram a aplicação de uma enzima produzida por fermentação em estado sólido e utilizaram para tanto resíduo de óleo de babaçu como meio de cultivo por *P. simplicissimum* e de um biossurfactante do tipo ramnolípido produzido por *P. aeruginosa* no pré-tratamento e tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves. Os autores selecionaram o tempo de 8 horas de pré-tratamento com a enzima e o biossurfactante, verificaram que a concentração da enzima, do biossurfactante e a interação entre o biossurfactante e a temperatura e demonstraram maior efeito significativo na hidrólise da gordura do efluente.

A análise de variância (ANOVA), calculada a partir dos valores médios de DQOs do tempo de pré-tratamento de 4,5 horas, está apresentada na Tabela 16.

Tabela 16 Análise de variância para o planejamento do DCCR em 4,5 horas, ao utilizar a concentração de biossurfactante e temperatura como variáveis independentes.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}
Regressão	303946,1	4	75986,5	5,8
Resíduos	78414,7	6	13069,1	
Falta de ajuste	76943,7	4	19235,9	
Erro puro	1471,1	2	735,5	
Total	382361,0	10		

Coeficiente de determinação: $R^2=0,79$; $F_{\text{tab } 0, 1, 4, 6} = 3,18$.

Observou-se que a regressão é significativa, além disso, o F calculado (5,8) é maior que o F tabelado (3,18), ou seja, a concentração de biossurfactante ou a temperatura influencia na solubilização da matéria orgânica na forma de DQO solúvel.

Obteve-se assim a equação do modelo:

Eq. (3)

$$\text{DQOs} = 1035,801 + 124,847 \cdot \text{BS} - 41,854 \cdot \text{BS}^2 + 135,059 \cdot \text{T} + 50,831 \cdot \text{T}^2$$

Onde BS = Biossurfactante e T = Temperatura.

Com base no modelo gerado para o aumento da DQO solúvel, foi construída a superfície de resposta (Figura 23), em função da temperatura e da concentração de biossurfactante, que mostra a tendência do que ocorreu.

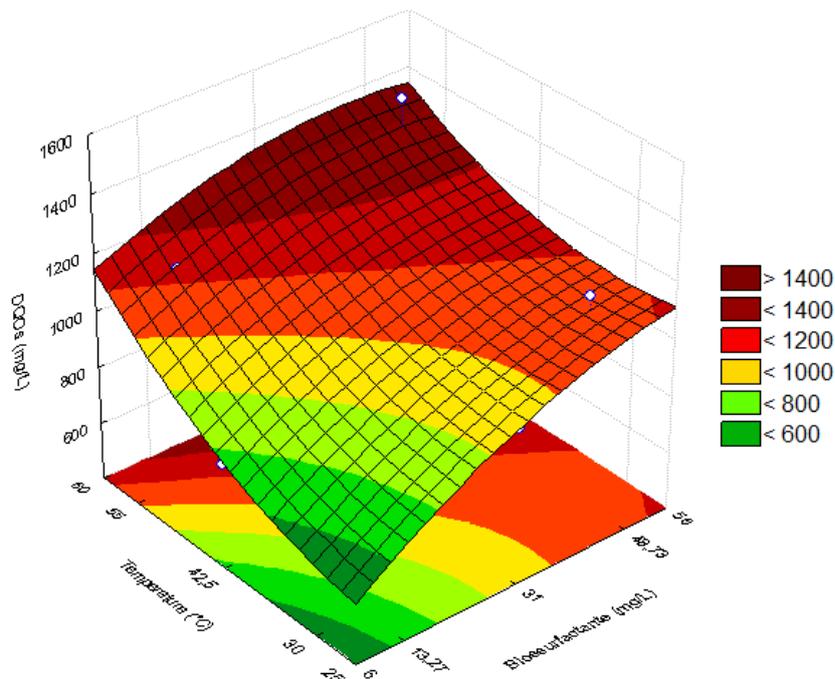


Figura 23 Superfície de resposta para o aumento de DQO_s em função da temperatura e concentração de biossurfactante.

Por meio da análise da superfície de resposta gerada pelo modelo, podem-se observar as condições de temperatura e concentração de biossurfactante que resultaram

em maior solubilização da DQO. É possível observar que em maiores temperaturas (60 °C) e em maiores concentrações de biossurfactante (56 mg.L⁻¹) encontram-se os maiores valores de aumento da solubilização da DQO, tais resultados corroboram com os obtidos por Damasceno (2013).

Obtiveram-se também os gráficos de desejabilidade, a fim de melhor demonstrar visualmente os comportamentos dos fatores envolvidos (Figura 24).

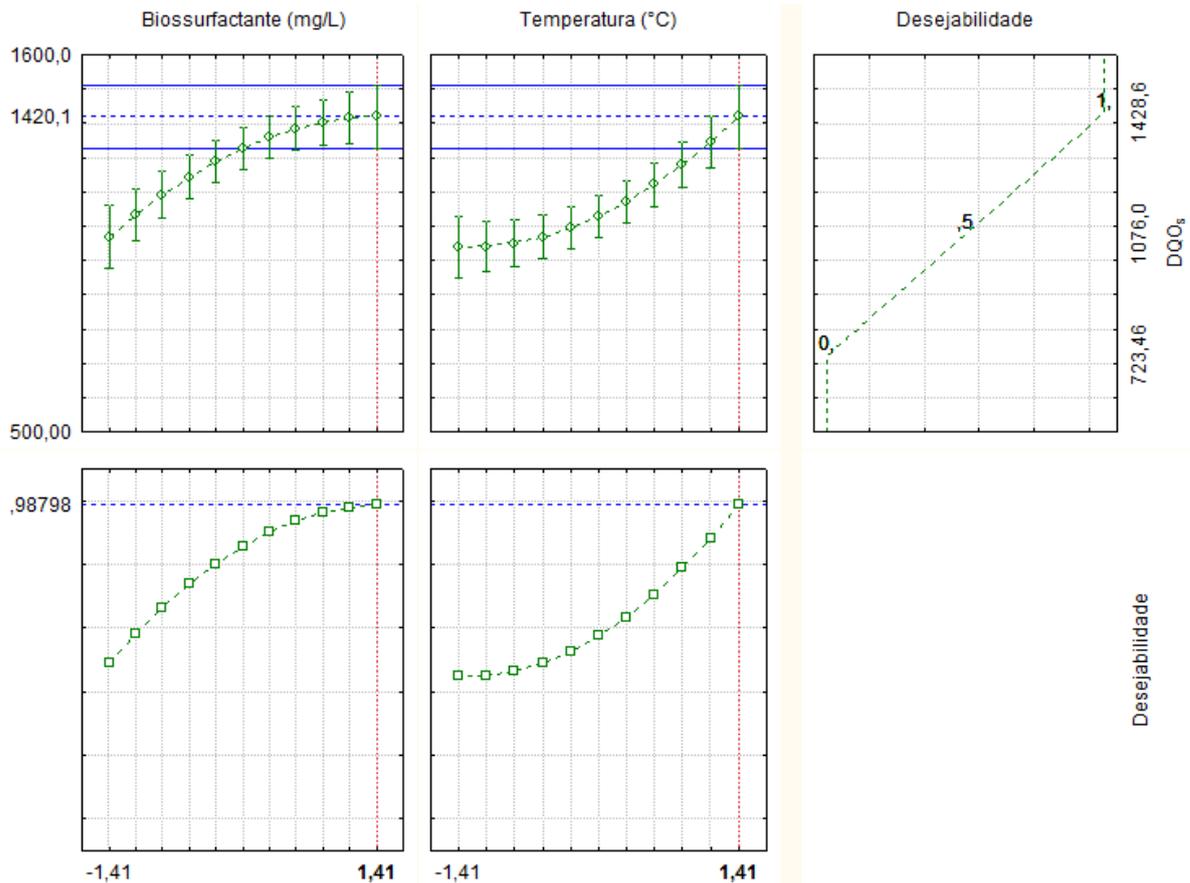


Figura 24 Gráficos de desejabilidade para os fatores concentração de biossurfactante e temperatura.

A partir dos gráficos de desejabilidade, foi possível observar que nas maiores concentrações de biossurfactante empregadas houve a maior solubilização de DQO e que, possivelmente, as concentrações utilizadas estejam muito próximas da capacidade máxima da surfactina em promover a solubilização. Isso pode ser visualizado no primeiro gráfico superior, onde há uma tendência da curva em se estabilizar.

Dessa forma, observou-se que as concentrações de surfactina acima da sua Concentração Micelar Crítica (CMC) podem promover melhor desempenho do que quando o biossurfactante é utilizado na sua CMC para essa finalidade. A observação difere do que geralmente é apresentado na literatura e demonstra que os surfactantes têm capacidade máxima de atuação até alcançar a própria CMC.

Damasceno et al. (2013) avaliaram uma mistura de *pool* enzimático e biossurfactante do tipo ramnolípídeo para pré-tratamento por 4 horas e posterior tratamento anaeróbio de

efluente de abatedouro de aves. Verificaram, com isso, que o biossurfactante em concentrações acima da sua CMC promovia efeitos inibitórios na atividade dos microrganismos da biodigestão anaeróbia.

No segundo gráfico superior, observa-se que a temperatura apresenta comportamento progressivo. Logo, isso indica que quanto maior for a temperatura maior será a solubilização de DQO. Porém, não é interessante a continuidade de otimização do processo de solubilização da DQO frente ao aumento da concentração de biossurfactante e da temperatura, principalmente, porque não é viável a aplicação prática de sistemas de pré-tratamento em que haja a necessidade de aquecer o efluente a elevadas temperaturas.

2.6 CONCLUSÕES

A caracterização do efluente de abatedouro de aves da agroindústria localizada na região oeste do Paraná demonstrou que os valores obtidos para a maioria dos parâmetros avaliados são similares aos reportados na literatura da área. Entretanto, a concentração de OG nesse efluente é reduzida em comparação com outros trabalhos. Portanto, é possível destacar o sistema de operação e recuperação de gordura da agroindústria, ou ainda, devido à vazão de água no processo, o que promove a diluição de tal componente.

Durante os ensaios de pré-tratamento do efluente de abatedouro de aves, observou-se que o tempo de 4,5 horas foi suficiente para solubilizar a DQO em sua máxima concentração.

Os ensaios permitiram inferir a tendência de que em maiores temperaturas e concentrações de surfactina (acima da sua CMC) encontram-se os maiores valores de aumento da solubilização da DQO.

2.7 REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**. Rio de Janeiro, 1987.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington, DC: APHA 2005.
- BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento. **Tratamento de esgoto: tecnologias acessíveis**. Informe infraestrutura. Área de projetos de infraestrutura. n. 16, 1997. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/infra/g7416.pdf> Acesso em: 28/08/2012.
- CALDERA, Y.; GUTIÉRREZ, E.; LUENGO, M.; CHÁVEZ, J.; RUESGA, L. Evaluación del sistema de tratamiento de aguas residuales de industria avícola. **Rev. cient. (Maracaibo)**, v. 20, n. 4, Maracaibo, 2010.
- CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G. A.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 23, n. 19, p. 1591-1595, 2001.
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.
- CHIPASA, K. B.; MEDRZYCKA, K. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 635–645, 2006.
- CIKOSKI, A.; ROTTA, M.; BECEGATO, V.; MACHADO, W. C. P.; ONOFRE, S. B. Caracterização de efluentes gerados no processo agroindustrial – Caso da indústria frigorífica. **Geoambiente Online**, Jataí, n. 11, 2008.
- CIRNE, D. G.; PALOUMET, X.; BJÖRNSSON, L.; ALVES, M. M.; MATTIASSON, B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste – Effects of lipid concentration. **Renewable Energy**, v. 32, p. 965-975, 2007.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 27/05/2012.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1511-1516, 2010.
- DALLAGO, R. C.; GOMES, S. D.; MEES, J. B. R.; ASSIS, T. M.; HASAN, S. D. M.; KUNZ, A. Nitrification and denitrification of a poultry slaughterhouse wastewater according to cycle time and ammoniacal nitrogen concentration using surface response methodology. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 10, n. 2, p. 856-860, 2012.

DAMASCENO, F. R. C. **Aplicação de preparado enzimático e biossurfactante no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura**. 2013. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

DAMASCENO, F. R. C.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 241-246, 2012.

DAMASCENO, S.; MEES, J. B. R.; COSTA JUNIOR, I. L.; BALDESSAR, V. T.; SHUMMAN, M. S. Caracterização e readequação de sistema de tratamento de efluentes de frigoríficos de aves. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS DE ANIMAIS – SIGERA, 2009. Florianópolis. **Anais eletrônicos...** Florianópolis: SBERA, 2009. Disponível em: <<http://sbera.org.br/sigera2009/downloads/obras/086.pdf>>. Acesso em: 17/06/2012.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Pretreatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 720-728, 2011.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

FORMENTINI, D. F.; COSTANZI, R. N.; HASHISUCA, A. M. S.; PAULILLO, G.; NETO, A. R. P.; MORAIS, J. Water conservation and reuse in poultry slaughterhouse of Matelandia-PR Brazil – A case study. In: RAMIRAN- RESEARCH NETWORK ON RECYCLING OF AGRICULTURAL AND INDUSTRIAL RESIDUES IN AGRICULTURE. 2010, Lisboa. **Anais eletrônicos...** 0210. Lisboa: RAMIRAN, 2010. Disponível em: <http://www.ramiran.net/ramiran2010/docs/Ramiran2010_0210_final.pdf>. Acesso em: 15/08/2012.

GALLERT, C.; WINTER, J. Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. In: JÖRDENING, H. J.; WINTER, J. **Environmental Biotechnology**, Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, 2005. p. 20-21.

GOMES, D. R. S.; PAPA, L. G.; CICHELO, G. C. V.; BELANÇON, D.; POZZI, E. G.; BALIEIRO, J. C.C.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TOMMASO, G. Effect of enzymatic pretreatment and increasing the organic loading rate of lipid-rich wastewater treated in a hybrid UASB reactor. **Desalination**, v. 279, p. 96-103, 2011.

IAP - INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Portaria IAP nº 112 de 7 de julho de 2008**. Disponível em: <http://celepar7.pr.gov.br/sia/atosnormativos/form_cons_ato1.asp?Codigo=2092>. Acesso em: 28/05/2012.

KIEPER, B. H.; MERKA, W. C.; FLETCHER, D. L. Proximate composition of poultry processing wastewater particulate matter from broiler slaughter plants. **Poultry Science**, v. 87, p. 1633-1636, 2008.

KIST, L. K.; MOUTAQI, S. E.; MACHADO, E. L. Cleaner production in the management of water use at a poultry slaughterhouse of Vale do Taquari, Brazil: a case study. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. 1200-1205, 2009.

KUMAR, A. G.; VENKATESAN, R.; KIRUBAGARAN, R.; PRABHAKAR, T. G.; SEKARAN, G. Effects of nonionic surfactant on hydrolysis and fermentation of protein rich tannery solid waste. **Biodegradation**, v. 19, p. 739-748, 2008.

- LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.
- LUCAS, A. P. C.; KOETZ, P. R.; PRZYBYLSKI, S. L. A. Tratamento anaeróbio de efluentes do processamento de corvina (*Micropogonias furnieri*) em reator UASB. **Vetor**, Rio Grande, v. 10, n. 9, p. 113-124, 2000.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.
- MASSE, L.; MASSÉ, D. I.; KENNEDY, K. J. Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1365-1372, 2003.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. DE.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JUNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. DE. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 185-190, 2006.
- MORAES, L. M.; PAULA JUNIOR, D. R. Gerenciamento de resíduos de abatedouros de aves: Alternativas de manejo e tratamento. In: 20º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. 019, 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: ABES, 1999. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/brasil20/iii-019.pdf>>. Acesso em: 16/08/2012.
- MOTTA, M., PONS, M.N., ROCHE, N., et al. Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: Validações e estudo de caso. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 8, n 3, p.170-181, 2003.
- NAKHLA, G.; AL-SABAWI, M.; BASSI, A.; LIU, V. Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. B102, p. 243-255, 2003.
- NARDI, I. R.; DEL NERY, V.; AMORIM, A. K. B.; SANTOS, N. G.; CHIMENES, F. Performances of SBR, chemical-DAF and UV disinfection for poultry slaughterhouse wastewater reclamation. **Desalination**, v. 269, n. 1-3, p. 184-189, 2011.
- OLIVEIRA, A. B. M.; ORRICO, A. C. A.; ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; SUNADA, N. S.; CENTURION, S. R. Biodigestão anaeróbia de efluente de abatedouro avícola. **Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 6, p. 690-700, 2011.
- PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633-654, 2011.
- PETRUY, R.; LETTINGA, G. Digestion of a milk-fat emulsion. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 141-149, 1997.
- QAMSARI, M.; KERMANSHAHI, K.; NOSRATI, M.; AMANI, T. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 2, p. 475-480, 2012.

RAUNKJAER, K.; HVITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. **Water Research**, v. 28, n. 2, p. 251–262, 1994.

RODRIGUES, M. I.; A. F. IEMMA. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

ROSA, D. R.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M.; FREIRE, D. M. G. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6170-6176, 2009.

SILVA, J. N.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Application of home-made enzyme and biosurfactant in the anaerobic treatment of effluent with high fat content. **Bioprocessing and Biotechniques**, v. 3, n. 3, 2013.

SINDIAVIPAR – SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS AVÍCOLAS DO ESTADO DO PARANÁ. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8&acao=frango>>. Acesso em: 17/09/2014.

VALLADÃO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, p. 219-225, 2007.

VALENTE, A. M.; ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. G.; FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v 30, n. 2, p. 483-488, 2010.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 232-239, 2000.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, v. 2, 210 p., 1996.

WILLEY, R. Fats, oils, and greases: the minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, p. 127-133, 2001.

CAPÍTULO 3 – TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO DE AVES PRÉ-TRATADO COM BIOSURFACTANTE

RESUMO

O tratamento anaeróbio de efluentes agroindustriais é uma alternativa para remoção da carga orgânica poluente presente. A biodigestão anaeróbia emprega microrganismos presentes em um inóculo (lodo anaeróbio) que promovem a degradação de substratos orgânicos e consequente produção de biogás. O efluente de abatedouro de aves tem como característica a presença de gorduras na forma de óleos e graxas (OG), uma vez que tais substâncias causam problemas operacionais nos sistemas de tratamento. Diante de tal fato, há a necessidade de se realizar uma etapa de pré-tratamento para remover os OG. Os pré-tratamentos comumente empregados utilizam de substâncias químicas para promover a remoção de OG. Mas, atualmente, são estudadas tecnologias que permitem manter as gorduras no efluente, e que tais compostos sejam assimilados pelos microrganismos para que haja, além da redução no uso de substâncias químicas, maior produção energética de biogás. O biossurfactante surfactina promove a interação entre substâncias imiscíveis, como óleo e água, além de promover a emulsificação da gordura. Neste trabalho, avaliou-se a biodigestão anaeróbia do efluente de abatedouro de aves pré-tratado com surfactina produzida em manipueira. O pré-tratamento foi realizado nas seguintes condições: temperatura de 30 °C, agitação de 150 rpm, tempo de 4,5 horas e concentrações de surfactina: 0, 6, 13,27, 31, 48,73 e 56 mg.L⁻¹. Para cada composição de surfactina foram pré-tratados 7 L de efluente, e cada qual foi tratada anaerobiamente, em triplicata, com o uso de eudiômetros para medir o volume de biogás e com réplicas destrutivas para avaliar temporalmente o perfil dos parâmetros físico-químicos avaliados em um período de 36 dias de biodigestão. A análise microbiológica do lodo anaeróbio foi realizada para a caracterização inicial e final do inóculo entre os tratamentos a partir das metodologias de *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) e coloração de Gram. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que o efluente de abatedouro de aves é passível de biodigestão anaeróbia, com produção de metano. O volume acumulado de metano ao final do experimento para o tratamento controle, em que não houve a adição de surfactina no pré-tratamento, foi o menor observado entre os tratamentos. A remoção da matéria orgânica solúvel na forma de DQO apresentou-se estatisticamente igual entre os tratamentos aplicados, e os OGs puderam ser disponibilizados com o efeito da temperatura sobre os constituintes do efluente ao invés da ação direta do biossurfactante na etapa de pré-tratamento, visto que no tratamento controle do tratamento anaeróbio também foi observada remoção significativa deste parâmetro. O acompanhamento dos ensaios, a partir de amostras destrutivas, permitiu constatar que o processo anaeróbio se desenvolveu adequadamente. Ainda, por meio das análises microbiológicas de FISH e coloração de Gram foi possível observar que o biossurfactante surfactina não inibiu o desenvolvimento dos gêneros bacterianos comumente presentes em tratamentos anaeróbios de efluentes, e apresentou em todos os tratamentos grande riqueza de espécies microbianas. De maneira geral, pode-se inferir que o biossurfactante surfactina não alterou significativamente qualquer propriedade do efluente de abatedouro de aves que permitisse melhorias na biodegradação anaeróbia e consequentemente maior produção de metano.

PALAVRAS-CHAVE: Biodigestão anaeróbia; surfactina; análises microbiológicas.

CHAPTER 3 – ANAEROBIC TREATMENT OF POULTRY SLAUGHTERHOUSE PRETREATED WITH BIOSURFACTANT

ABSTRACT

The anaerobic treatment of agroindustrial effluents is an alternative to remove the organic pollutant load. Anaerobic digestion uses microorganisms in an inoculum (anaerobic sludge) that promote degradation of organic substrates and consequent biogas production. The poultry slaughterhouse effluent has fats as oils and greases (OG), since these substances cause operational problems in the systems of treatment. According to this, it is important to carry out a pretreatment phase to remove the OG. Pretreatments, often employed, have used chemicals to promote OG removal. But, currently, technologies that keep fat in effluent are studied and such compounds are assimilated by microorganisms so that there is, besides reduction in the use of chemicals, more energy production of biogas. The biosurfactant surfactin promotes interaction among immiscible substances, like oil and water, as well as fat emulsification. In this trial, anaerobic digestion of poultry slaughterhouse wastewater, pre-treated with surfactin produced in cassava, was evaluated. The pretreatment was carried out under the following conditions: temperature 30 °C, 150 rpm stirring, 4.5-hour duration and surfactin concentrations: 0, 6, 13.27, 31, 48.73 and 56 mg.L⁻¹. For each composition of surfactin, 7 liters of effluent were pretreated and each one was treated anaerobically in triplicate using eudiometers to measure the biogas volume and destructive replications to evaluate, temporally, the profile of physiochemical parameters evaluated during 36 days of digestion. Microbiological analysis of anaerobic sludge was carried out for the initial and final characterization of inoculum among treatments according to the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) and Gram stain methodologies. Based on the obtained results, it was observed that the poultry slaughterhouse effluent can have anaerobic digestion, with methane production. At the end of this trial, the accumulative volume of methane for the control treatment in which there was no addition of surfactin in pretreatment was the lowest one observed among treatments. The removal of soluble organic matter in COD form was statistically equal among the applied treatments, and OGs could be provided with the temperature effect on the effluent constituents instead of direct action of biosurfactant during the pretreatment phase, whereas on the control treatment of anaerobic treatment, it was also observed a significant removal of this parameter. The assays monitoring, from destructive samples, showed that the anaerobic process was developed properly. Still, based on microbiological analyses of FISH and Gram stain methodologies, it was observed that the surfactin biosurfactant did not inhibit the development of bacterial genera commonly present in anaerobic treatment of effluents, and showed in all treatments a great number of microbial species. In general, it can be inferred that surfactin biosurfactant did not change significantly any property of the poultry slaughterhouse that could allow improvements in anaerobic biodegradation and consequently greater production of methane.

KEYWORDS: Anaerobic digestion; surfactin; microbiological analyses.

3.1 INTRODUÇÃO

A agroindústria abatedora de aves é muito desenvolvida e de relevada importância econômica e social no estado do Paraná. Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido voltadas também para a importância ambiental da atividade avícola, visto que os abatedouros de aves utilizam elevados volumes de água no processo de abate e preparação das carcaças. A água utilizada no processo chega ao sistema de tratamento com alta carga orgânica, e contém principalmente proteínas e lipídeos provenientes dos animais.

No Brasil, comumente, são utilizadas lagoas em série ou biodigestores para o tratamento biológico de efluentes de agroindústrias. No tratamento convencional, as tecnologias empregadas incluem a adição de coagulantes químicos (pré-tratamento), os quais promovem uma separação parcial da matéria orgânica devido à sedimentação ou flotação de proteínas e gorduras, e minimizam-se problemas operacionais na planta de tratamento de efluentes, tais como: desenvolvimento de lodo de baixa atividade, flotação do lodo, entupimento de dutos, solubilização de gases e colapso do sistema. Porém, há a questão dos custos na obtenção dos produtos químicos, da ineficiência de remoção da gordura e da formação de um resíduo sólido que requer descarte apropriado.

A manutenção dos lipídeos no efluente de abatedouros de aves, ou seja, sem a sua separação do restante na etapa de pré-tratamento, pode ser interessante no sentido de que esse material apresenta elevado potencial energético. Dessa forma, há a possibilidade de geração de biogás e metano com a aplicação do tratamento anaeróbio, o qual pode ser utilizado como fonte de energia pela própria indústria.

Dentre as alternativas propostas para o tratamento de efluentes com óleos e graxas (OG), há a possibilidade da incorporação de biossurfactantes diretamente no sistema de tratamento biológico. Os surfactantes têm a função de aumentar a interação água/óleo, emulsionar a gordura, aumentar a solubilização e acelerar a degradação pelos microrganismos. Dessa forma, os OGs podem ser mantidos no efluente, assim, elimina-se a necessidade de utilização de produtos químicos na etapa de pré-tratamento.

Nesse sentido, esse capítulo aborda a avaliação do tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves após a utilização do biossurfactante surfactina produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira (efluente de fecularia), na etapa de pré-tratamento.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Avaliar o tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves, pré-tratado com surfactina produzida em manipueira.

3.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a influência da aplicação da surfactina na biodigestão anaeróbia do efluente;
- Avaliar a produção volumétrica de metano e redução da matéria orgânica dentre os tratamentos aplicados;
- Avaliar a degradação temporal do efluente de abatedouro de aves, pré-tratado com diferentes concentrações de surfactina a partir de monitoramento semanal da biodigestão;
- Analisar qualitativamente a composição microbiana do lodo anaeróbio utilizado no tratamento anaeróbio por meio das técnicas de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) e esfregaço por coloração de Gram.

3.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.3.1 Biodigestão anaeróbia de efluentes

A biodigestão anaeróbia é um processo onde não há necessidade de oxigênio para que ocorra a degradação dos componentes orgânicos presentes em um resíduo. A maioria do carbono orgânico presente no resíduo é reduzida a metano (CH₄), o último produto do metabolismo biológico em ambiente anaeróbio. Para que isso ocorra, estão envolvidos diversos grupos de microrganismos capazes de realizar reações independentes, mas de forma coordenada (ANDERSON; SALLIS; UYANIK, 2003).

Dentre as características favoráveis da biodigestão anaeróbia, Chernicharo (1997) cita a baixa produção de sólidos, baixo consumo de energia, baixos custos de implantação e operação, tolerância a elevadas cargas orgânicas, e possibilidade de operação com elevados tempos de retenção de sólidos e baixos tempos de retenção hidráulica. Essas características conferem aos reatores anaeróbios um grande potencial de aplicabilidade no tratamento de águas residuárias concentradas e diluídas.

Aquino e Chernicharo (2005) destacam que o uso dessa tecnologia para tratamento de esgotos torna-se mais atrativo no Brasil devido às condições climáticas, aceitação e disseminação de reatores anaeróbios, em especial aqueles de manta de lodo.

Conforme Anderson; Sallis e Uyanik (2003) e Aquino e Chernicharo (2005), na biodigestão anaeróbia podem ser identificados os seguintes processos e microrganismos envolvidos:

I. Hidrólise de biopolímeros (proteínas, carboidratos e lipídeos): ao considerar que as bactérias metanogênicas são incapazes de utilizar diretamente os substratos complexos, esses materiais necessitam ser primeiramente quebrados em monômeros solúveis. Conseqüentemente, a hidrólise é o primeiro passo essencial na degradação anaeróbia de biopolímeros complexos. No digestor anaeróbio são produzidas enzimas extracelulares hidrolíticas que atacam substratos complexos, tais como protease, lipase, celulase, pectinase, amilase, quitinase etc. Os microrganismos envolvidos estão incluídos em vários gêneros, tais como: *Clostridium*, *Peptococcus*, *Vibrio*, *Micrococcus* e *Bacillus*. Além de bactérias, alguns protozoários tais como *Trepomonas*, *Tetramitus* e *Trichomonas* e fungos como *Phycomycetes* e *Ascomycetes* têm sido observados em reatores anaeróbios.

II. Fermentação de aminoácidos e açúcares: Os monômeros produzidos na hidrólise são fermentados durante a segunda etapa, e produzem diversos produtos intermediários, como acetato, propionato, butirato e hidrogênio. Cada produto final contém um grupamento ácido carboxílico que foi introduzido durante a fermentação; por isso, os microrganismos

responsáveis pela fermentação são chamados de bactérias formadoras de ácido, divididas em dois grupos: acidogênicas e acetogênicas.

IIA. Acidogênese: as bactérias acidogênicas ou fermentativas provêm importantes substratos para as acetogênicas e metanogênicas. Elas metabolizam os aminoácidos, os açúcares e os ácidos graxos resultantes da hidrólise da matéria orgânica complexa em produtos intermediários ou ácidos orgânicos, como acético, propiônico e butírico, hidrogênio e dióxido de carbono (CO₂). Nas acidogênicas estão incluídos os gêneros: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Escherichia*.

As bactérias acidogênicas possuem baixo tempo mínimo de geração (~30 minutos) e as mais elevadas taxas de crescimento do consórcio microbiano. Dessa forma, a etapa acidogênica só será limitante do processo se o material a ser degradado não for facilmente hidrolisado (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

IIB. Acetogênese: as bactérias acetogênicas produzem acetato, CO₂ e hidrogênio para suprir as metanogênicas na etapa final da digestão anaeróbia. Dois grupos distintos de acetogênicas estão presentes: o primeiro grupo, as acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio (APOH) produzem ácido acético, CO₂ e hidrogênio a partir dos intermediários dos ácidos graxos (propionato e butirato), alcoóis e outros ácidos graxos. As APOHs são importantes na β-oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, provenientes da hidrólise de lipídeos, e também estão envolvidas na degradação de compostos aromáticos. As APOHs e as metanogênicas estão envolvidas em uma interação mutualística, pois as primeiras são inibidas pelo hidrogênio (substrato das metanogênicas), enquanto as metanogênicas necessitam de hidrogênio para prosperar e são inibidas pelos ácidos graxos (substrato das APOHs). Esse estado de equilíbrio é muito frágil e pequenas perturbações podem levar a efeitos inibitórios. Nas APOHs estão presentes as espécies: *Syntrophomonas wolfei* e *Syntrophobacter wolinii*.

O segundo grupo de bactérias acetogênicas são as homoacetogênicas, que são estritamente anaeróbias e catalisam a formação de acetato do hidrogênio e do CO₂. Os gêneros incluem: *Acetobacterium*, *Acetoanabacterium*, *Acetogenium*, *Butyribacterium*, *Clostridium* e *Pelobacter*.

III. Produção de metano: na etapa final da digestão anaeróbia estão presentes as bactérias metanogênicas, as quais são anaeróbias estritas e formam metano como produto final de seu metabolismo a partir do acetato, do hidrogênio e do CO₂. Elas são diferentes das bactérias típicas (*Eubacteria*) e são classificadas em um domínio separado, as *Archaea*. De acordo com sua especificidade ao substrato, as metanogênicas são divididas em acetoclásticas e hidrogenotróficas.

As metanogênicas acetoclásticas utilizam o acetato, proveniente das acetogênicas, para formar metano (70%), e, nesse grupo, estão presentes dois gêneros: *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. As metanogênicas hidrogenotróficas, por sua vez, reduzem CO₂, e formam metanol enquanto as metilaminas utilizam o hidrogênio produzido pelas bactérias hidrolíticas e são formadoras de ácido para produzir metano (30%).

Mc Carty, Jeris e Murdoch (1963) explicam que os ácidos acético, propiônico e butírico compreendem a maior parte dos ácidos formados no tratamento anaeróbio de materiais orgânicos complexos. A maior parte do metano formado nesse processo resulta da decomposição desses ácidos pelas bactérias metanogênicas. Um aumento súbito na concentração de ácidos voláteis indica que as metanogênicas não foram capazes de remover os ácidos tão rapidamente quanto eles foram formados, e esse é um dos primeiros indícios de biodigestão desbalanceada.

3.3.2 Efeito da presença de gordura ou lipídeos no tratamento biológico anaeróbio

Segundo Petruy e Lettinga (1997), os lipídeos possuem pouca biodegradabilidade devido à baixa biodisponibilidade dos mesmos. O depósito de elevadas concentrações de gordura na biomassa causa a queda de eficiência de sistemas de tratamento biológico de efluentes.

De acordo com Chipasa e Medrzycka (2006), os lipídeos são degradados mais lentamente pelos microrganismos presentes no tratamento biológico do que vários substratos considerados, como açúcares e aminoácidos. Enquanto açúcares e aminoácidos apresentam constantes de degradação de 0,16 a 0,78.h⁻¹, os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) apresentam valores de 0,005 a 0,04 h⁻¹, ou seja, de 10 a 100 vezes menores, em condições experimentais semelhantes. Isso faz dos lipídeos o componente limitante do tratamento, cuja hidrólise a ácidos graxos é a etapa limitante na biodegradação (MASSE; MASSÉ; KENNEDY, 2003).

Os problemas metabólicos ocasionados pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa baseiam-se na inibição da atividade metanogênica. A degradação dos AGCL é feita via β-oxidação por bactérias acetogênicas, que produzem acetato e hidrogênio, que são convertidos em metano e CO₂. No entanto, as reações de β-oxidação só são termodinamicamente favoráveis se a pressão parcial de hidrogênio for mantida em níveis baixos, inferiores a 10⁻⁴ atm, o que é conseguido pela associação das metanogênicas. Além disso, os ácidos graxos saturados de cadeia longa (C12 – C14) e os ácidos graxos insaturados são reportados como inibidores de vários microrganismos, principalmente as metanogênicas, que removem o hidrogênio (Vidal et Al., 2000; Demirel; Yenigun; Onay,

2005; Mendes et al., 2005), porque inibem a síntese de enzimas envolvidas com a síntese de ácidos graxos.

Na Figura 25 é apresentado um esquema da degradação anaeróbica de gorduras.

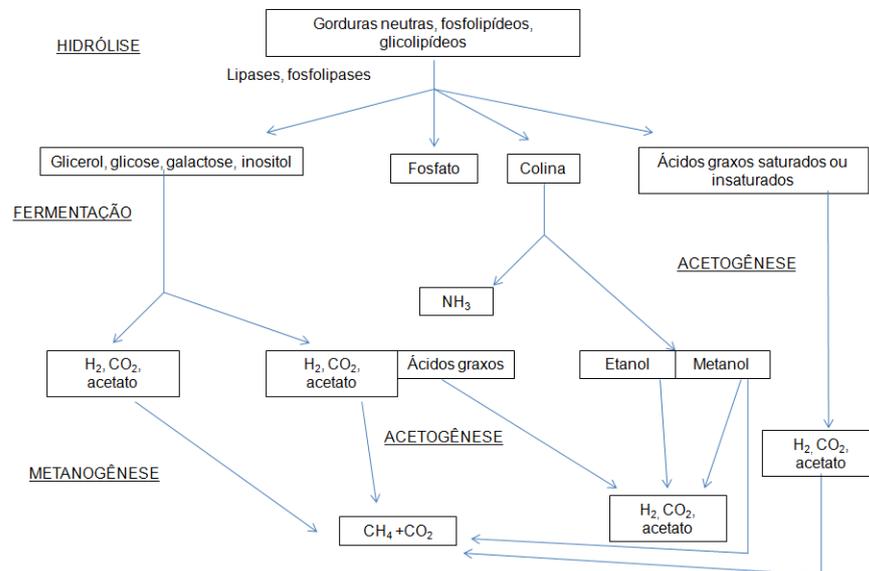


Figura 25 Degradação anaeróbica de gorduras.

Fonte: Adaptado de Gallert; Winter (2005).

Steil (2007) explica que o distúrbio entre as populações microbianas de um nível trófico afeta toda a comunidade e causa desequilíbrios que se refletem na eficiência de todo o processo, com acúmulos de compostos intermediários, mudanças de pH ou redução da eficiência do sistema de tratamento anaeróbico.

Para Mendes; Pereira e Castro (2006), em alguns efluentes que apresentam grande quantidade de gorduras, como efluente de abatedouro de aves, por exemplo, a biodigestão anaeróbica pode ser problemática, pois pode ocorrer a flotação do lodo, formação de espuma na superfície do reator e acúmulo de compostos intermediários.

Moraes e Paula Junior (1999) citam que a remoção da gordura do efluente de abatedouro de aves é operação essencial, antes do tratamento biológico, já que está presente em teores elevados e pode comprometer a eficiência e o funcionamento geral desta etapa do tratamento. Os autores verificaram que esse fato tem ocorrido em vários sistemas em operação no Brasil.

Nesse sentido, para que o tratamento biológico seja desenvolvido com menor inibição do material orgânico presente no efluente, há a necessidade de que se reduza a concentração de gorduras, óleos e proteínas, ou eliminem-se todos esses materiais (Cammarota; Freire, 2006), pois a presença de óleos e graxas no efluente com concentração acima de 800 mg.L^{-1} pode causar problemas operacionais nos processos de tratamento biológico (JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002; LEAL et al., 2006; ALBERTON, 2009).

Para remover a gordura de efluentes agroindustriais antes do tratamento biológico, atualmente, empregam-se as técnicas de pré-tratamento termoquímico com saponificação da gordura (Batimelli; Arrère; Delgenès, 2009) e flotação com adição de produtos químicos (NARDI; FUZI; DEL NERY, 2008; DEL NERY et al., 2007; CAIXETA et al., 2002). Nesses casos, há os gastos com o ar induzido e com os reagentes utilizados, além de poder haver baixa eficiência de remoção de material dissolvido e/ou emulsionado e há a produção de lodo de difícil descarte e tratamento (AL-MUTAIRI; AL-SHARIFI; AL-SHAMMARI, 2008; SCHOENHALS; SENA; JOSÉ, 2006).

Os lipídeos apresentam elevado potencial de produção de metano (1,014 L CH₄.g SSV), superior aos carboidratos e proteínas, os quais apresentam 0,415 e 0,496 L CH₄.g SSV, respectivamente (Angelidaki; Sanders, 2004). Tal característica torna os lipídios atrativos para uso no tratamento anaeróbico de efluentes e possibilita produzir volumes mais elevados de metano (DEMIREL; YENIGUN; ONAY, 2005).

3.3.2 Aplicação de biossurfactantes no tratamento de efluentes

Devido ao aumento da preocupação com a proteção ambiental, os biossurfactantes passaram a ser considerados como alternativas ambientalmente corretas comparativamente aos surfactantes sintéticos (SARACHAT et al., 2010).

Diversos setores demandam compostos com as características dos surfactantes, tais como: petroquímico, alimentos, bebidas, cosméticos, farmacêutico, mineração, metalúrgico, agroquímico, fertilizantes, ambiental, papel e celulose, entre outros (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; NITSCHKE; COSTA, 2007; ISLAS; MORENO; RODRÍGUEZ, 2010).

O uso de biossurfactantes no tratamento de efluentes foi avaliado por alguns autores na tentativa de aumentar a interação água-óleo, acelerar a degradação da gordura presente pelos microrganismos e promover a biorremediação de águas contaminadas. A aplicação de biossurfactantes no tratamento de efluentes industriais tornou-se alvo de investigação por parte de pesquisadores como alternativas aos processos convencionais.

Zhang et al. (2009) estudaram a aplicação de biossurfactante do tipo ramnolípido produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em lodo ativado para o tratamento aeróbio de óleo de fritura residual. Os resultados obtidos demonstraram que enquanto o tratamento com o biossurfactante em escala de bancada removeu mais de 93% dos óleos e graxas, o tratamento controle removeu apenas 10% e em escala piloto essa remoção foi de 95% e 17%, respectivamente. Dessa maneira, os autores concluíram que a adição do biossurfactante mostrou grande potencial para o tratamento de águas residuárias com gordura.

Daverey e Pakshirajan (2011) avaliaram o pré-tratamento de efluente sintético de efluente de laticínio com a levedura *Candida bombicola* produtora do biossurfactante do tipo soforolípido. Foram utilizadas três configurações de biorreatores para o pré-tratamento: descontínuo, em batelada alimentada e de modo contínuo. Os resultados demonstraram completa utilização das gorduras presentes no efluente após 96 horas de operação bem como remoção de DQO acima de 93%. Concluiu-se que há um bom potencial para a utilização do sistema no tratamento de efluentes de laticínios.

Silva et al. (2013) promoveram a aplicação de um biossurfactante do tipo ramnolípido e de uma enzima, ambos produzidos em escala laboratorial, no pré-tratamento de efluente de abatedouro de aves, a fim de que fossem avaliados o tratamento anaeróbio e a produção de biogás. O uso do biossurfactante promoveu a redução de 30% na quantidade da enzima a ser utilizada para liberar a mesma quantidade de ácidos graxos. Além disso, a pré-hidrólise com a enzima e o biossurfactante e o posterior tratamento anaeróbio promoveram a redução da DQO e o aumento na produção de metano, enquanto o efluente não hidrolisado não produziu metano.

3.3.3. Análises microbiológicas para o monitoramento de lodos anaeróbios

O conhecimento da comunidade microbiana no tratamento anaeróbio é de crucial importância para o entendimento dos processos metabólicos envolvidos nas etapas de degradação, e para a consequente otimização do processo de tratamento. As técnicas moleculares permitiram o acesso a uma maior variedade de espécies, informações sobre a distribuição geográfica, a atividade celular, relações ecológicas e proporções numéricas das diferentes populações microbianas (DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005; STEIL, 2007).

Rosa et al. (2009) descrevem que o conhecimento sobre a ecologia e dinâmica dos microrganismos presentes no lodo anaeróbio é importante para a elucidação de problemas causados pelo acúmulo de gordura no lodo. O uso de técnicas moleculares como ferramentas complementares aos métodos tradicionais de microbiologia promove a abertura de uma nova e refinada abordagem para lidar com essa questão.

As técnicas de biologia molecular, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH), são utilizadas para identificação específica, quantificação, caracterização da estrutura e da distribuição espacial da comunidade microbiana presente em amostras complexas, inclusive lodos e biofilmes (AMANN et al., 1995).

Tais técnicas moleculares são baseadas no uso de biomarcadores, as quais são moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões variáveis, específicas de cada um. As regiões variáveis podem ser consideradas a

impressão digital de um organismo (PACE et al., 1986 *apud* ABREU, 2007). Um biomarcador comumente utilizado para inferir identidade de organismos é a molécula de RNA ribossomal, biomarcador denominado RNAr. O RNAr é parte integrante do ribossomo, uma estrutura celular responsável pela síntese de proteínas que está presente em todas as células e, por isso, é considerado um biomarcador ideal.

A região 16S compõe a subunidade menor dos ribossomos presentes em organismos procariontes (bactérias e arqueias). A variação genética do RNAr 16S tem sido bem explorada para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos e “desenhar” sondas nucleotídicas específicas aplicadas na detecção de grupos microbianos individuais em habitats naturais. Essas técnicas são aplicáveis também para se determinar a diversidade genética de comunidades microbianas e identificar os microrganismos não cultiváveis (OLSEN et al., 1986; MUYZER; WALL; UITTERLINDEN, 1993).

Para a realização da hibridização *in situ* com oligonucleotídeos fluorescentes ou FISH, o RNA não é extraído, mas permanece dentro das células microbianas. Essas, por sua vez, são fixadas em solução de paraformaldeído para preservação e formação de poros para penetração da sonda fluorescente. As células são, então, tratadas com tampão que contém formamida e NaCl e incubadas em temperatura entre 45 a 48 °C para hibridização da sonda em regiões específicas do RNAr 16S. A sonda de oligonucleotídeo é marcada com cromóforo que fluoresce quando excitada por uma luz de determinado comprimento de onda (normalmente, luz ultravioleta). A detecção é feita por microscopia de fluorescência, na qual a amostra hibridizada é iluminada com a luz excitante e a luz emitida é observada com o auxílio de filtros específicos. A emissão de sinal é diretamente proporcional à quantidade de ribossomos do microrganismo, que indica sua atividade metabólica potencial no ecossistema estudado. Pelo fato das células não serem destruídas, essa técnica permite a visualização morfológica, a contagem e estimativa da abundância, a localização e a distribuição espacial dos microrganismos na amostra (AMANN et al., 1995).

FISH é uma técnica molecular que tem sido utilizada em estudos de investigação e avaliação de microrganismos presentes em lodos anaeróbios de sistemas de tratamento e tem a vantagem de não requerer o cultivo dos microrganismos. Araújo et al. (2010) avaliaram a presença de bactérias *annamox* pela técnica de FISH, provavelmente *Candidatus Brocadia anammoxidans*, em reator em batelada sequencial cujo tratamento era de esgoto doméstico. Os autores observaram que após seis meses de cultivo, tais bactérias representavam 53% do total de células presentes no reator.

Nishio (2010) avaliou a comunidade microbiana presente em lagoa de estabilização facultativa de tratamento de esgoto doméstico e, para tanto, utilizou as técnicas conjuntas de PCR, DGGE e FISH. As amostras foram coletadas em três períodos para avaliação temporal e em três profundidades da lagoa. A utilização das técnicas em conjunto demonstrou que a comunidade da lagoa variou temporalmente e na sua distribuição

horizontal. A técnica de CARD-FISH revelou que a lagoa é dominada pelo filo *Cyanobacteria*. As técnicas de biológica molecular utilizadas simultaneamente revelaram ser eficientes para avaliar a comunidade microbiana da lagoa.

Abreu (2004), por sua vez, utilizou a técnica FISH para avaliar e monitorar a diversidade microbiológica no processo de lodo ativado de uma estação de tratamento de esgoto municipal. A técnica molecular permitiu a identificação de bactérias filamentosas pertencentes às espécies *Haliscomenobacter hydrossis* e *Gordona*.

Além das técnicas moleculares, a técnica de esfregaço por Coloração de Gram também é interessante para os estudos da composição microbiana do lodo. A coloração de Gram é um dos procedimentos de coloração mais úteis, pois classifica as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas. Os diferentes tipos de bactérias reagem de modo diferente à coloração de Gram, porque diferenças estruturais em suas paredes celulares afetam a retenção ou liberação dos corantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Vários autores utilizam a técnica para avaliar a comunidade microbiana presente em lodos de reatores biológicos. Miqueleto (2003) avaliou a composição microbiana presente em um reator anaeróbio em batelada sequencial que continha biomassa imobilizada e foi submetido ao aumento progressivo de substrato de fácil degradação. Nas amostras retiradas do meio suporte, a autora utilizou a coloração de Gram e verificou a presença de bacilos de dimensões variadas, víbrios, cocos ovalados, agrupamento de cocos, *Methanosarcina* e filamentos com inclusões.

Leite (2010) avaliou a produção de bio-hidrogênio a partir do efluente de parboilização de arroz e observou a morfologia bacteriana por meio da coloração de Gram. Os resultados demonstraram a predominância de bacilos e microrganismos gram-negativos no lodo UASB, e a presença de leveduras no lodo acidogênico.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Tratamento anaeróbio do efluente pré-tratado com surfactina

Ensaio de biodigestão anaeróbia a partir dos ensaios de pré-tratamento foram realizados a fim de avaliar o tratamento do efluente de abatedouro de aves com os resultados obtidos pelo DCCR (Capítulo 2). Os ensaios de tratamento anaeróbio foram realizados com o efluente bruto (sem adição de surfactina) como controle e com o efluente com as seguintes concentrações de surfactina: 6, 13,27, 31, 48,73 e 56 mg.L⁻¹. Tais efluentes já haviam passado pelo processo de pré-tratamento: 4,5 horas de incubação, temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm.

A caracterização do efluente de abatedouro de aves e do lodo anaeróbio utilizados nos ensaios de tratamento anaeróbio está apresentada na Tabela 17.

Tabela 17 Caracterização do efluente de abatedouro de aves e do lodo utilizados no tratamento anaeróbio.

Parâmetros	Valores médios
Alcalinidade Total (AT) (mg.L ⁻¹)	185
Acidez Volátil (mg.L ⁻¹)	243
Cor (mg.L ⁻¹)	47
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg.L ⁻¹)	2360
Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQO _s) (mg.L ⁻¹)	590
Óleos e Graxas (OG) (mg.L ⁻¹)	535
pH	6,17
Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) (mg.L ⁻¹)	515
Sólidos Dissolvidos Fixos (SDF) (mg.L ⁻¹)	217
Sólidos Dissolvidos Voláteis (SDV) (mg.L ⁻¹)	297
Sólidos Totais (ST) (mg.L ⁻¹)	1594
Sólidos Totais Fixos (STF) (mg.L ⁻¹)	208
Sólidos Totais Voláteis (STV) (mg.L ⁻¹)	1386
Temperatura (°C)	23
Turbidez (UNT)	180
Lodo anaeróbio	
Sólidos Suspensos Voláteis (mg.L ⁻¹)	23071

Foram pré-tratados sete litros de efluente, em triplicata, para cada composição, cujo total foi de 18 unidades experimentais, em regime descontínuo, temperatura de 34 °C e sem agitação.

O modelo esquemático de uma unidade experimental utilizada no tratamento anaeróbio do efluente está apresentado na Figura 26.

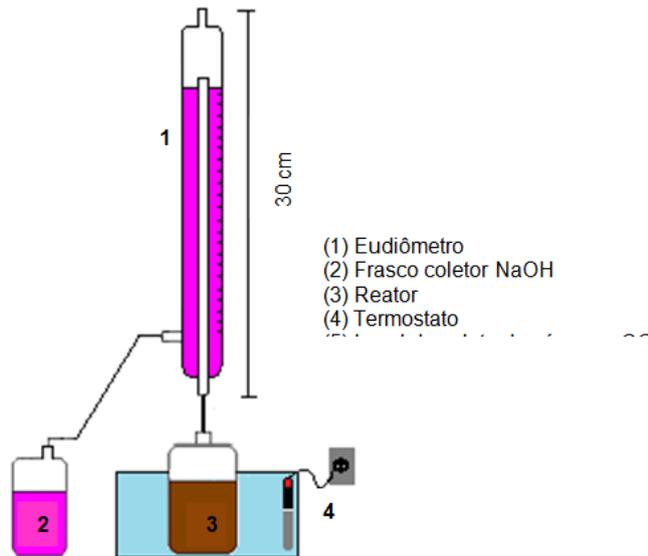


Figura 26 Modelo esquemático de uma unidade experimental utilizada no tratamento anaeróbico do efluente.

O aparato experimental completo consistiu de: (1) Uma caixa plástica de 62 L, preenchida com água, utilizada como recipiente de banho-maria; (2) Dois termostatos de 100 W utilizados para aquecimento e manutenção da temperatura a 34° C do banho-maria; (3) Dezoito frascos de vidro (tipo reagente) de 610 mL de volume, com volume útil de 450 mL utilizados como reatores; (4) Dezoito eudiômetros confeccionados em vidro, nas dimensões: diâmetro de 50 mm, comprimento de 300 mm e saída com tubos de 8 mm, capacidade volumétrica total de 450 mL. Um eudiômetro é um instrumento de laboratório que mede o volume de uma mistura gasosa após uma reação física ou química.

Cada eudiômetro apresenta um tubo interno em vidro, com comprimento de 220 mm para a passagem do biogás do reator para dentro da câmara que possui a solução filtrante do gás. A filtração do biogás a fim de remover o CO₂ pode ser realizada física ou quimicamente. Conforme descrito por Magalhães et al. (2004), a remoção do dióxido de carbono ou de qualquer outro gás por absorção é uma operação unitária, na qual um componente de uma mistura é dissolvido em um líquido. Nesse caso, foi utilizada uma solução de NaOH a 20% para absorver o CO₂ presente no biogás.

Os frascos reatores foram vedados com rolha de borracha e conectados aos eudiômetros por meio de tubo de vidro e mangueiras de silicone. Os eudiômetros foram operados de acordo com o trabalho de Suárez et al. (2012).

Nas Figuras 27 e 28 estão apresentados o aparato experimental completo e os reatores anaeróbios utilizados no tratamento anaeróbico do efluente.

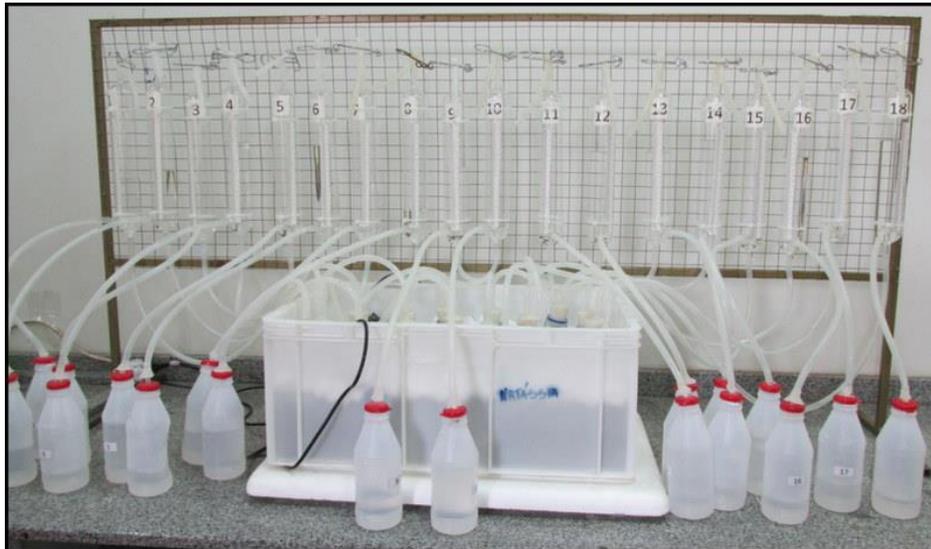


Figura 27 Aparato experimental completo utilizado no tratamento anaeróbico do efluente.

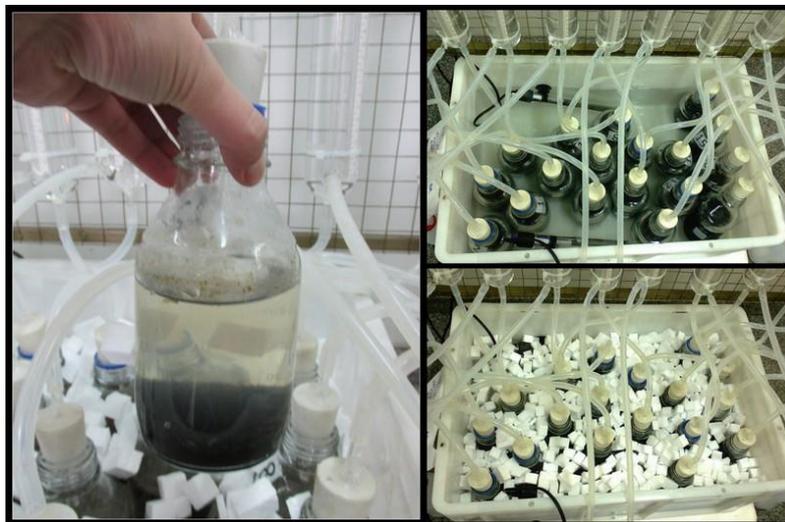


Figura 28 Vista superior da disposição dos reatores anaeróbios na caixa de banho-maria.

Recortes de isopor foram dispostos na superfície do banho-maria para evitar que a água evaporasse facilmente e também para manter a temperatura do banho.

O inóculo utilizado nessa etapa foi o lodo anaeróbico proveniente de biodigestor de fecularia. Os volumes de efluente e de lodo foram calculados a fim de obter uma relação DQO inicial: SSV de 1:1 nos frascos reatores, os quais foram mantidos em regime estático a 34 °C.

Na Figura 29 estão apresentadas as composições aplicadas na etapa de tratamento anaeróbico do efluente pré-tratado com surfactina.

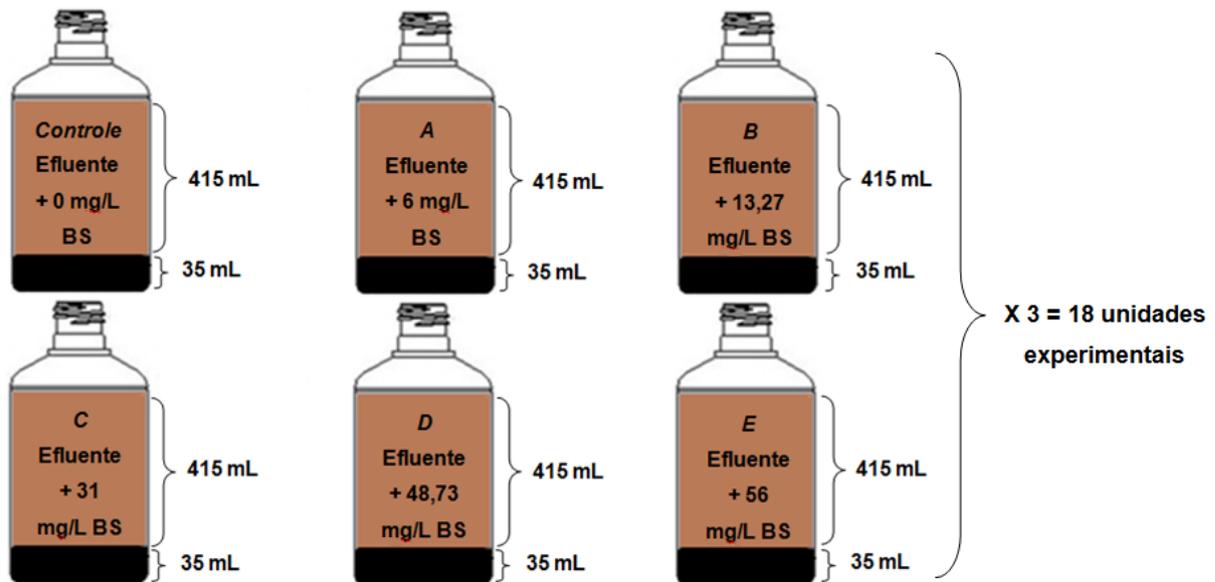


Figura 29 Composições dos efluentes pré-tratados aplicados na etapa de tratamento anaeróbio.

Cada composição consistiu no volume de 415 mL de efluente pré-tratado ou não com surfactina e 35 mL de lodo anaeróbio utilizado como inóculo, com total de 450 mL de volume útil em cada reator.

O pH do efluente pré-tratado, por apresentar valor médio de 6,17, não foi ajustado antes da mistura com o lodo. A mistura foi submetida à purga de oxigênio por meio do borbulhamento de N_2 por 5 minutos em cada frasco a fim de garantir a condição anaeróbia nos reatores. Os frascos foram então selados com uma tampa de borracha e conectados aos eudiômetros.

A produção de biogás foi observada através do aparato experimental supra para cada tratamento. A produção de biogás foi avaliada de forma volumétrica, ou seja, o biogás produzido nos reatores segue para o interior do eudiômetro pelo tubo que os conecta e que está acima do nível da solução de NaOH. O gás produzido exerce pressão sobre a coluna de NaOH e desloca o volume de líquido correspondente. A leitura do volume de gás produzido foi realizada diariamente por meio de régua de 20 cm fixadas nos eudiômetros. Cada eudiômetro foi calibrado para saber exatamente quantos mililitros possui em cada centímetro.

Concomitantes ao aparato experimental com os eudiômetros, para cada tratamento, foram desenvolvidas diversas réplicas utilizadas como amostras destrutivas com a finalidade de avaliar o perfil temporal do tratamento anaeróbio para cada composição. Para isso, foram utilizadas garrafas plásticas de 500 mL com volume útil de 450 mL com as mesmas condições dos tratamentos observados nos eudiômetros. Elas estavam incubadas a 34 °C em câmara BOD (Figura 30).



Figura 30 Reatores armazenados em câmara BOD: Réplicas destrutivas dos tratamentos anaeróbios desenvolvidos nos eudiômetros.

Para cada período de análise, duas réplicas de cada tratamento foram analisadas quanto à biodegradabilidade do efluente, por meio da remoção de DQOs, óleos e graxas, ácidos orgânicos voláteis, série de sólidos, pH, alcalinidade e relação acidez/alcalinidade (AV/AT). Na Tabela 18, estão apresentadas as amostras empregadas, os parâmetros analisados, a periodicidade de análise, os métodos e as metodologias empregados.

Tabela 18 Parâmetros, periodicidade, local de coleta, métodos e metodologias empregados na avaliação do tratamento anaeróbio.

Parâmetros	Periodicidade	Local	Métodos	Metodologias
Produção de biogás	Diária	Eudiômetros	Volumétrico	AQUINO et al. (2007)
DQO solúvel	1 vez semana e final do processo	Destrutiva e eudiômetros	Colorimétrico	APHA et al. (2005)
Ácidos orgânicos voláteis	1 vez semana	Destrutivas	Cromatografia líquida (HPLC)	LAZARO (2009)
pH	1 vez semana	Destrutivas e eudiômetros	Potenciométrico 4500H	APHA et al. (2005)
Óleos e graxas	1 vez semana	Destrutivas e eudiômetros	Gravimétrico 5520D	APHA et al. (2005)
Relação Acidez Volátil/Alcalinidade Total	1 vez semana	Destrutivas	2310B/2320B	APHA et al. (2005)
Avaliação da comunidade microbiana	Início e final do processo	Lodo anaeróbio	FISH / Coloração de Gram	HIRASAWA (2008) / RIBEIRO; SOARES(1993)

Alíquotas para a caracterização inicial foram tomadas de cada composição antes do contato com o lodo bem como do próprio lodo. Os resultados obtidos na etapa de tratamento anaeróbio foram avaliados por estatística descritiva e teste Tukey com 95% de significância e auxílio do *software* Statistica 8.

3.4.2 Avaliação microbiológica do lodo anaeróbio

3.4.2.1 Hibridização *In Situ* com Sondas Fluorescentes

A diversidade microbiana presente no lodo de cada um dos tratamentos aplicados foi avaliada pela técnica de Hibridização *in situ* com Sondas Fluorescentes (FISH). Geralmente, para amostras provenientes de reatores biológicos anaeróbios, são utilizadas as sondas de oligonucleotídeos específicos para os membros do Domínio *Bacteria* (EUB 338), Domínio *Archaea* (ARC915) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) da subdivisão delta de *Proteobacteria* (SRB385) (HIRASAWA, 2007).

A técnica adotada na análise de FISH, segundo Amann et al. (1995), foi realizada no Laboratório de Enzimologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, PR.

A técnica de FISH envolve as seguintes etapas: desprendimento celular, lavagem e fixação das células do lodo granulado, filtração, hibridização, microscopia de fluorescência e quantificação dos microrganismos de acordo com metodologia descrita por HIRASAWA (2008).

Para desprender as células da amostra de lodo foi tomado, em triplicata, 1 mL do lodo macerado, o qual foi colocado em tubos de centrifugação estéreis. Foram adicionados 4 mL de solução tampão fosfato salino (PBS (1X): 130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7,2) com 0,1% de detergente Tween 80. Os frascos foram agitados em agitador magnético por cinco minutos. As amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por um minuto sob refrigeração (15 °C).

Em seguida, as amostras foram submetidas à lavagem e fixação das células, realizada com PBS (1X) e solução de fixação (2 g paraformaldeído, 150 µl NaOH 1N, 5 mL PBS (10X) em 50 mL de água ultrapurificada) por duas vezes, através de centrifugação (9000 rpm por 1 minuto a 15 °C). O material foi ressuspensão com 200 µl de PBS (1X) e 600 µl de tampão de fixação gelado e mantido por 12 horas a -4 °C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por duas vezes com PBS 1X e ressuspensas em PBS 1X/etanol (1:1, v/v).

A filtração das alíquotas de células em triplicata (100 µL) foi realizada a vácuo (< 0,02 Mpa) em membrana de polycarbonato de poro 0,2 µm, 25 mm diâmetro, cor preta (marca Millipore), já que as membranas foram secas ao ar. Desse material, uma seção de membrana foi corada com DAPI (4', 6' - diamino-2-fenilindol) como agente fluorescente, a concentração final de 1 µg/mL, a 4 °C, por 30 minutos, em ambiente escuro e foi adicionada entre lâmina e lamínula gotas de Vectashield (H-1200), para quantificação celular sob microscopia de epifluorescência.

Anterior à hibridização e à quantificação com DAPI, cada membrana foi cortada em seções, e mantiveram-se sempre algumas seções reservadas para a necessidade de repetição do procedimento.

Em seguida, em ambiente escuro, foram aplicados 20 uL do tampão de hibridização (NaCl 0,9 M, Tris-HCl 20 mM, SDS 0,01%, pH 7,4) que continha 50 ng de sonda fluorescente e quantidade adequada de formamida, sobre cada seção da membrana filtrante, previamente acomodada sobre uma lâmina. Para promover a hibridização, a lâmina foi transferida para um tubo de polipropileno (50 mL) com tampa de rosca, revestido com papel alumínio e com papel filtro umedecido com tampão de hibridização no seu interior. Esse tubo funcionou como uma câmara escura e úmida, para evitar a secagem indevida das células e a alteração das concentrações dos componentes da solução de hibridização. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 46 °C por 90 minutos e, após decorrido esse período, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (NaCl 0,9 M; Tris-HCl 20 mM, SDS 0,01%, pH 7,4), a 48 °C, por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram imediatamente mergulhadas em água destilada e secas ao ar, na ausência de luz.

Na etapa de montagem das lâminas, cada lâmina foi devidamente identificada e recebeu uma seção da membrana e antes da colocação da lamínula foram adicionadas gotas de Vectashield H-1200, cuja função é preservar a fluorescência por mais tempo, a fim de que se evite a rápida fotodegradação dos fluorocromos.

As amostras coradas com DAPI foram excitadas por laser Ar a 488 nm e a fluorescência recuperada através do filtro U-MWU2 para luz UV, enquanto as sondas marcadas com Cy3 foram excitadas por laser a 543 nm e a fluorescência recuperada com o filtro U-MSWG2 para luz verde.

A morfologia celular da biomassa proveniente dos reatores foi analisada por microscopia ótica com o auxílio do microscópio Olympus modelo BX60 acoplado com câmera digital DP71, software DP Controller 3.2.1.276 (Olympus), além de epifluorescência e objetiva de imersão (100x).

As sondas filogenéticas marcadas com o corante fluorescente Cyanine (Cy3) foram sintetizadas pela empresa Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemanha. A relação das sondas utilizadas e suas características estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 Sequências das sondas filogenéticas utilizadas.

Sonda	Sequência 5' para 3'	Estringência	Molécula alvo	Organismo
EUB 338 I	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	0-50%	16S rRNA	Domínio <i>Bacteria</i>
EUB338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	0-50%	16S rRNA	Domínio <i>Bacteria</i>
EUB338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	0-50%	16S rRNA	Domínio <i>Bacteria</i>
ARC915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	20%	16S rRNA	Domínio <i>Archaea</i>
SRB385	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	35%	16S rRNA	Bactérias redutoras de sulfato

Na Figura 31 são apresentados os procedimentos realizados na técnica de FISH.

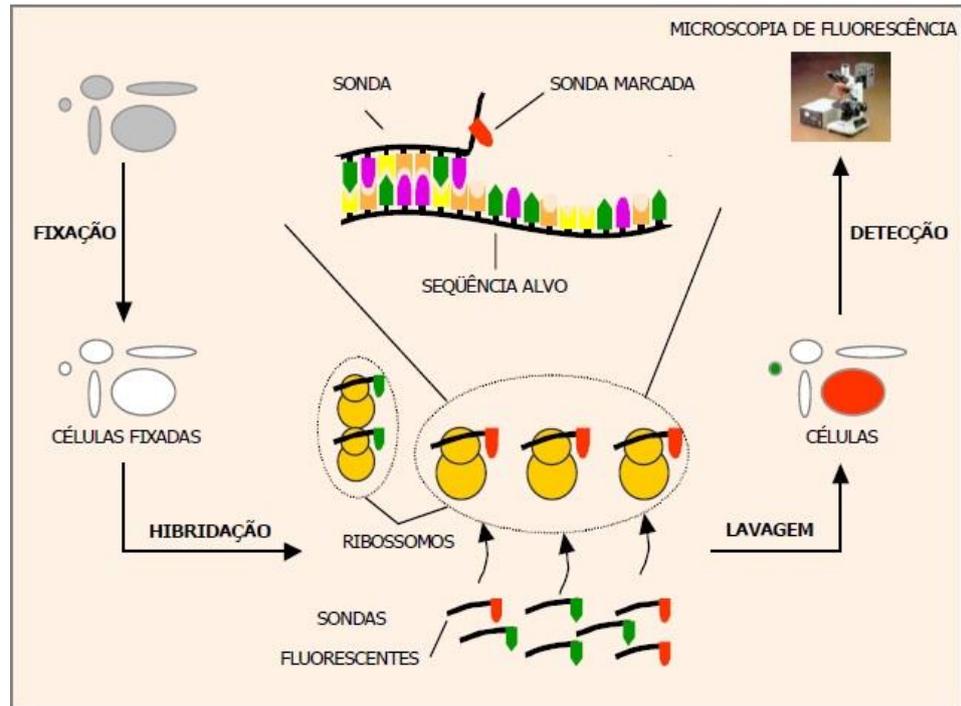


Figura 31 Procedimentos realizados na técnica de FISH: fixação, hibridação, lavagem e detecção.

Fonte: Domingues (2001).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Monitoramento do tratamento anaeróbio

O tratamento anaeróbio do efluente pré-tratado com a surfactina foi conduzido por 36 dias (5 semanas). Os resultados obtidos durante a biodigestão estão apresentados nessa seção. Durante o desenvolvimento do tratamento anaeróbio as amostras destrutivas, réplicas daquelas desenvolvidas nos eudiômetros, foram utilizadas para avaliar o processo semanalmente.

3.5.1.1 pH

Na Tabela 20 são apresentados os valores de pH obtidos semanalmente nas amostras destrutivas e obtidos no início e no final da biodigestão desenvolvida nos eudiômetros para cada tratamento.

Tabela 20 Valores de pH observados durante a biodigestão anaeróbia nas amostras destrutivas e nos eudiômetros.

Amostras	Semanas	Tratamentos					
		1	2	3	4	5	6
Destrutivas	Início	6,17	6,10	6,15	6,22	6,19	6,32
	1	6,43	6,51	6,35	6,47	6,40	6,44
	2	6,51	6,49	6,44	6,56	6,50	6,58
	3	6,43	6,47	6,32	6,50	6,40	6,53
	4	6,39	6,35	6,35	6,41	6,30	6,32
	5	6,25	6,31	6,28	6,37	6,38	6,33
Eudiômetros	Início	6,17	6,10	6,15	6,22	6,19	6,32
	5ª semana	7,33	7,31	6,87	7,30	7,13	6,97

Observou-se que, no decorrer das semanas, o pH das amostras destrutivas não sofreu grandes alterações e manteve-se na faixa de pH 6,0 para todos os tratamentos. O pH apresentado pelas amostras dos eudiômetros manteve-se entre os valores de 6,10 a 7,33. O aumento observado no pH das amostras dos eudiômetros é devido à captura de CO₂ pela solução de hidróxido de sódio utilizada, enquanto nas amostras destrutivas não houve a captura deste gás.

Se o processo anaeróbio for bem desenvolvido, o pH é mantido relativamente neutro, no entanto, se algum fator for alterado e ocorrer diminuição no valor do pH, isso precisa ser

corrigido para evitar a diminuição da atividade biológica do sistema, que apresenta como consequência a diminuição na produção de gás (KEEFER; URTES, 1962).

As bactérias produtoras do metano sobrevivem em uma faixa variável de pH entre 6,5 e 8,0 (Sosa; Chao; Rio, 2004) e tais microrganismos apresentam crescimento ótimo na faixa de 6,6 a 7,4, embora se possa conseguir estabilidade na formação de metano em uma faixa mais ampla de pH (entre 6,0 e 8,0) (CHERNICHARO, 2007).

Dessa forma, enquanto as bactérias constantes dos estágios iniciais de hidrólise, fermentação e acidogênese e da acetogênese da digestão anaeróbia produzem ácidos, as bactérias produtoras de metano consomem tais ácidos, a fim de manter o meio neutro (SOSA; CHAO; RIO, 2004).

3.5.1.2 Alcalinidade total e acidez volátil

Na Figura 32 é apresentado o comportamento do parâmetro Alcalinidade Total (AT) no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.

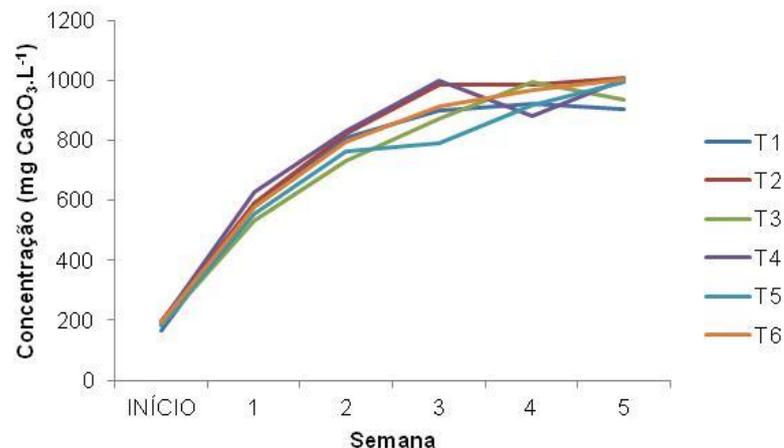


Figura 32 Comportamento do parâmetro alcalinidade total no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.

Observou-se que houve aumento crescente no parâmetro AT para todos os tratamentos durante as cinco semanas de biodigestão anaeróbia. Os valores médios observados entre todos os tratamentos variaram de 186,14 a 974,33 mg CaCO₃.L⁻¹. A AT representa, segundo Leite et al. (2004), a soma da alcalinidade advinda dos ácidos orgânicos voláteis (AOV) (acético, propiônico, butírico e láctico) e dos bicarbonatos.

A interação da alcalinidade com os AOV durante a digestão anaeróbia fundamenta-se na capacidade da alcalinidade em neutralizar os ácidos formados no processo e também em tamponar o pH, na eventualidade de um acúmulo de AOV (CHERNICHARO, 2007).

Na Figura 33 é apresentado o comportamento do parâmetro Acidez Volátil (AV) no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.

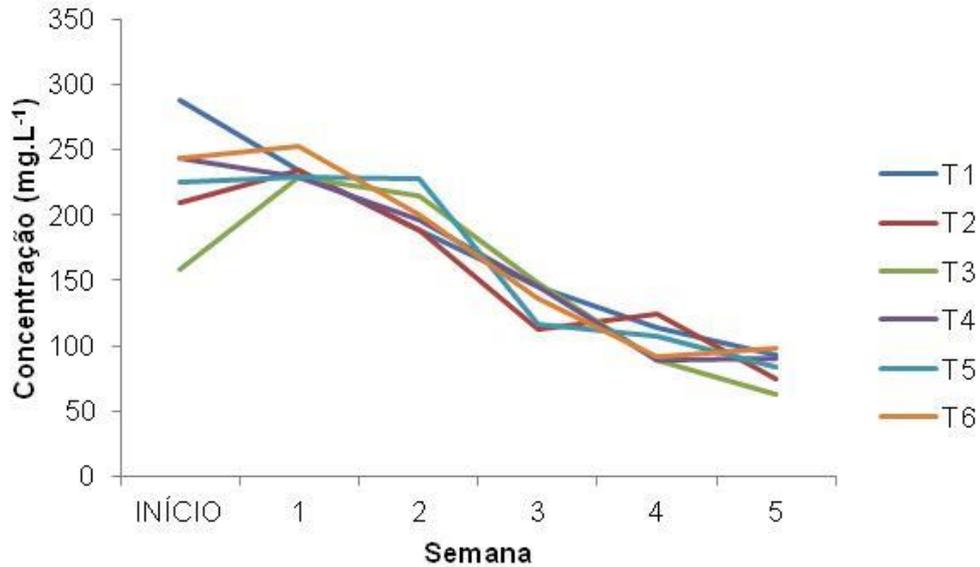


Figura 33 Comportamento do parâmetro acidez volátil no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.

Observou-se que houve diminuição no parâmetro AV para todos os tratamentos durante as cinco semanas de biodigestão anaeróbia. Os valores médios de AV observados entre todos os tratamentos variaram de 228 a 83,98 mg.L⁻¹ do início ao fim da biodigestão. A acidez dos reatores pode ter diminuído devido à utilização dos ácidos graxos pelas bactérias acidogênicas, uma vez que resultados similares foram observados por Correia e Del Bianchi (2008) ao estudarem um reator anaeróbio compartimentado vertical no tratamento de água residuária da produção de farinha de mandioca.

Na Figura 34, está apresentado o perfil da relação acidez volátil/alcalinidade total (AV/AT) no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.

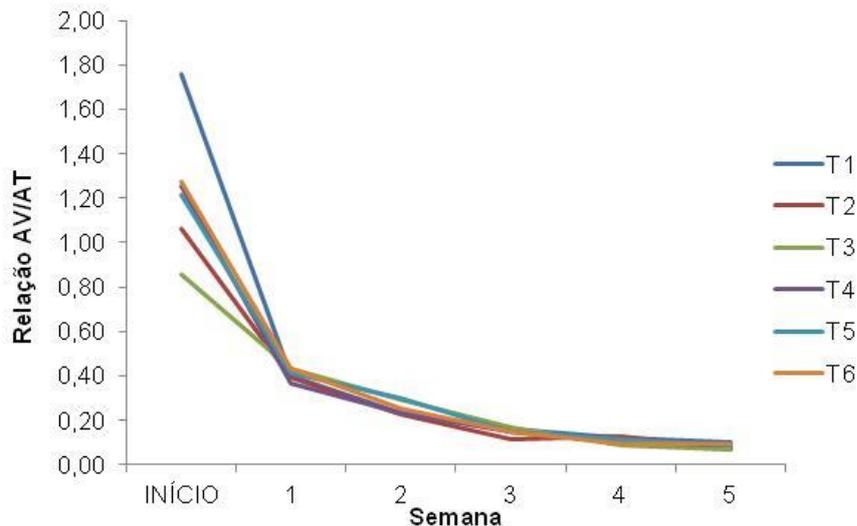


Figura 34 Relação acidez volátil/alcalinidade total no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia para os tratamentos aplicados.

A relação AV/AT indica a estabilidade do reator e neste trabalho observou-se que esta relação apresentou os seguintes valores iniciais: T1 = 1,76; T2 = 1,06; T3 = 0,86; T4 = 1,26; T5 = 1,21 e T6 = 1,28, com diminuição progressiva desta relação no decorrer do tratamento anaeróbio. O valor médio final entre todos os tratamentos foi de 0,09.

Verificou-se que do início da biodigestão até a análise da primeira semana, a relação AV/AT já se encontrava dentro da faixa de estabilidade do reator, a qual segundo Barana; Cereda (2000) é de 0,1 a 0,3. Valores em torno de 0,4 demonstram instabilidade e acima de 0,8 podem levar ao colapso da biodigestão.

Correia e Del Bianchi (2008) também descrevem que quanto menor a relação acidez/alcalinidade, melhor é a estabilidade de reatores para o tratamento anaeróbio de efluentes agroindustriais.

No estudo de Zenatti (2011), um reator anaeróbio de mistura completa foi utilizado na codigestão anaeróbia de glicerina bruta e água residuária da suinocultura. A autora verificou valores da relação AV/AT de 0,2 a 1,8 durante os três meses de operação do sistema, com limite máximo especificado para esta relação de 1,0.

3.5.1.3 Perfil da matéria orgânica solúvel na biodigestão anaeróbia

A matéria orgânica solúvel do efluente foi avaliada por Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQOs) que, na maioria das vezes, é o material mais rapidamente biodegradado pelos microrganismos (DAMASCENO, 2013).

Na Tabela 21 são apresentadas as concentrações de DQOs de cada tratamento para cada tipo de amostra no início, durante e ao fim da biodigestão anaeróbia bem como a porcentagem de remoção da matéria orgânica na forma solúvel.

Observa-se na Tabela 21 que há diferenças nas concentrações iniciais de DQOs entre os tratamentos. Tais dados podem ser devido à adição de surfactina ou à presença de grumos de material orgânico flutuante no efluente que foram desagregados durante o pré-tratamento.

Com os resultados das amostras destrutivas, foi possível observar que, nas três primeiras semanas de biodigestão, ocorreu a maior conversão da matéria orgânica solúvel. Também se verificou que a porcentagem de remoção da DQOs variou de 79,01 a 84,53%. Com os resultados das amostras dos eudiômetros, observou-se que a porcentagem de remoção da DQOs variou de 80,35 a 85,14%, além de haver pouca diferença entre os tipos de amostras (destrutivas ou de eudiômetros) e seus respectivos tratamentos.

Tais resultados permitem inferir que o tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves é uma opção viável, visto que Chernicharo (2007) considera o sistema anaeróbio eficiente para o tratamento de águas residuárias, quando a remoção de matéria orgânica for superior a 65%.

Tabela 21 Concentrações e porcentagem de remoção de DQOs para as amostras destrutivas e dos eudiômetros no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia.

Amostras	Semana	Concentração DQOs (mg.L ⁻¹)					
		Tratamentos					
		1	2	3	4	5	6
Destrutivas	Início	505,63	529,69	492,92	508,24	629,30	763,00
	1	528,35	517,00	569,80	491,58	538,38	565,12
	2	282,19	299,34	350,18	303,01	310,37	325,07
	3	93,19	91,37	167,31	116,18	114,74	172,88
	4	99,62	125,00	135,77	112,31	200,45	126,26
	5	94,55	96,45	103,43	99,62	111,04	118,01
	% remoção DQOs	81,30	81,80	79,01	80,40	82,35	84,53
Eudiômetros	Início	505,63	529,69	492,92	508,24	629,30	763,00
	5ª semana	85,89	104,07	85,04	92,65	97,30	113,37
	% remoção DQOs	83,01	80,35	82,74	81,77	84,53	85,14

A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de médias Tukey foram realizados com os resultados finais (5ª semana) da DQOs dos eudiômetros. Na Tabela 22 é apresentada a ANOVA dos valores médios de DQOs apresentados pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.

Tabela 22 Análise de variância dos valores médios de DQOs apresentados pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.

Fonte variação	GL	SQ	QM	F	p-valor
Tratamento	5	1803,3	360,7	11,12	0,000358
Erro	12	389,2	32,4		
Total	17	2192,5			

Nível de significância: 5%.

As hipóteses testadas foram:

- H0: Os valores médios de DQOs são iguais entre os tratamentos;
- H1: Os valores médios são diferentes, ou seja, pelo menos uma das médias é diferente das demais.

O F calculado obtido foi de 11,12, valor maior que o F tabelado (3,11) e o p-valor observado é menor que 5%. Desta forma, rejeita-se H0 e conclui-se que pelo menos um tratamento exerce efeito sobre as DQOs.

Após a ANOVA ser significativa, testaram-se as suposições do modelo com os testes de Levene (homogeneidade das variâncias) e Shapiro-Wilk (normalidade).

Levene:

- H0: As variâncias são iguais;
- H1: Pelo menos dois tratamentos possuem variâncias diferentes.

O teste de Levene forneceu o p-valor de 0,08, ou seja, o p-valor é maior que o nível de significância de 5%. Desta forma, não se rejeita H0 e conclui-se que a variável resposta (DQOs) apresenta homogeneidade das variâncias.

Shapiro-Wilk:

- H0: Yij tem distribuição normal;
- H1: Yij não tem distribuição normal.

O teste de Shapiro-Wilk nos forneceu o p-valor de 0,5138, ou seja, o p-valor é maior que o nível de significância de 5%, e desta forma se aceita H0 e conclui-se que a variável resposta apresenta distribuição normal de probabilidade.

Após a ANOVA ser significativa e os dados satisfazerem as suposições do modelo, foi realizado o teste Tukey de comparação múltipla de médias, que compara quais tratamentos possuem a mesma média de resposta.

Tukey:

- H0: média T1 = média T2 = média T3 = média T4 = média T5 = média T6;
- H1: T1≠T2≠T3≠T4≠T5≠T6.

Na Tabela 23 é apresentado o teste de Tukey para comparação das médias de DQOs apresentadas pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.

Tabela 23 Teste de Tukey para comparação das médias de DQOs apresentadas pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.

Tratamentos	$\alpha=5\%$
1 = Controle	85,89 a
2 = 6 mg.L ⁻¹ BS	104,07 bc
3 = 13,27 mg.L ⁻¹ BS	85,04 a
4 = 31 mg.L ⁻¹ BS	92,65 ab
5 = 48,73 mg.L ⁻¹ BS	97,30 ab
6 = 56 mg.L ⁻¹ BS	113,37 c

*Letras iguais correspondem a médias iguais. BS = biossurfactante surfactina.

As médias de DQOs finais observadas para os tratamentos 1, 3, 4 e 5 não diferem entre si, ou seja, tais tratamentos apresentam estatisticamente a mesma média de remoção de DQO solúvel, logo diferem das médias dos tratamentos 2 e 6. Para o nível de significância testado, as médias dos tratamentos 2, 4 e 5 não diferem entre si bem como as médias dos tratamentos 2 e 6.

Observa-se que quatro dos seis tratamentos (inclui-se nisso o controle) não apresentaram diferenças estatísticas de remoção. Os outros dois tratamentos apresentaram diferenças na remoção de DQOs, mas na prática da área de tratamento de efluentes agroindustriais são diferenças pouco significativas, principalmente ao se considerar a variabilidade de composição que tais efluentes apresentam.

Nakhla et al. (2003) estudaram o efeito da adição de um biossurfactante proveniente de cactos para o tratamento anaeróbio de efluente com elevado teor de óleos e graxas (OG = 38800 mg.L⁻¹), proveniente de indústria de ração animal. Os autores concluíram que, após 16 dias de biodigestão anaeróbia, a adição do biossurfactante no efluente bruto removeu a DQOs de 11200 para 7050 mg.L⁻¹.

Daverey e Pakshirajan (2011) avaliaram o pré-tratamento de efluente de laticínio ao utilizarem o biossurfactante do tipo soforolípido produzido por *Candida bombicola*. Os resultados mostraram que a eficiência de remoção de DQO foi de 93% após 96 horas de operação.

O surfactante sintético Tween 80 foi utilizado por Kumar et al. (2008) como substrato no processo de tratamento anaeróbio de resíduos sólidos de curtume. A adição do surfactante no processo aumentou significativamente as atividades hidrolíticas e catalíticas das enzimas (proteases e deaminases). Os resultados indicaram que, ao adicionar o surfactante a esse processo de tratamento, houve aumento da utilização do resíduo pelos microrganismos, e, por sua vez, ocorreu melhora nas conversões metabólicas.

Damasceno; Cammarota e Freire (2012) avaliaram o uso combinado de um biossurfactante do tipo ramnolípido e um preparado enzimático para o tratamento de efluente de abatedouro de aves com alta concentração de gordura (2403 mg.L⁻¹) e DQO de 8692 mg.L⁻¹. Os autores realizaram o pré-tratamento do efluente com a enzima e o biossurfactante e posteriormente foi avaliado o tratamento anaeróbio da melhor condição

encontrada. As concentrações da enzima que estavam acima de 0,5% (p/v) ou as do biossurfactante que estavam abaixo da Concentração Micelar Crítica (CMC) ($<205 \text{ mg.L}^{-1}$) promoveram efeitos inibitórios ou tóxicos às bactérias anaeróbias. Na concentração ideal, ambos metabólitos microbianos demonstraram ação simultânea na disponibilidade/hidrólise de gorduras, e os autores concluíam que há potencial para aplicação no tratamento de efluentes de abatedouros de aves sem a necessidade de uma etapa de flotação.

Jacobucci; Oriani e Durrant (2009) observaram, por meio da redução da DQO, a aplicação de duas espécies bacterianas produtoras de biossurfactante (*Pantoea agglomerans* e *Planococcus citreus*) e do biossurfactante produzido por elas, em efluente gorduroso proveniente de indústria de sabão e margarina. O efluente apresentava DQO de 4400 mg.L^{-1} , e foram obtidas remoções de 70 a 76% nos níveis de DQO com a aplicação das cepas bacterianas e dos biossurfactantes após 24 horas de contato com o efluente.

3.5.1.4 Óleos e Graxas

Na Tabela 24 são apresentadas as concentrações de Óleos e Graxas (OG) de cada tratamento a para cada tipo de amostra durante e ao fim da biodigestão anaeróbia bem como a porcentagem de remoção deste parâmetro.

Tabela 24 Concentrações e porcentagem de remoção de OG para as amostras destrutivas e dos eudiômetros no decorrer das semanas de biodigestão anaeróbia.

Amostras	Semana	Concentração óleos e graxas (mg.L^{-1})					
		Tratamentos					
		1	2	3	4	5	6
Destrutivas	Início	519,93	519,93	519,93	519,93	519,93	519,93
	1	181,67	152,45	134,17	138,64	118,09	210,78
	2	79,18	140,26	115,36	59,56	43,53	104,20
	3	70,15	97,05	27,51	50,29	22,32	81,94
	4	42,20	54,55	13,07	38,16	20,45	29,10
	5	38,41	1,67	10,10	33,55	1,64	17,68
	% remoção OG	92,61	99,67	98,05	93,54	99,68	96,59
Eudiômetros	Início	519,93	519,93	519,93	519,93	519,93	519,93
	5ª semana	62,54	75,27	97,26	0	141,62	144,07
	% remoção OG	87,97	85,52	81,29	100	72,76	72,29

No decorrer do período de biodigestão anaeróbia, foi possível observar a remoção de OG na faixa de 92,61 a 99,68% com média de 96,69% entre todos os tratamentos aplicados nas amostras destrutivas. Observa-se que, nessas amostras, praticamente não há diferença

de remoção de OG entre os tratamentos, ou seja, com a aplicação ou não do biossurfactante, houve excelente remoção dos OG do efluente. O tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves, nessas condições, produziu efluente dentro do limite exigido pela legislação (Resolução CONAMA Nº 430/2011), abaixo de 50 mg.L^{-1} (BRASIL, 2011).

As amostras dos eudiômetros apresentaram concentrações diferentes daquelas observadas em suas réplicas destrutivas. Isso pode ter ocorrido devido a erros inerentes à rotina laboratorial, visto que a metodologia empregada para a determinação de OG no trabalho (gravimétrica) requer grande volume de amostra para ser filtrada (acima de 2L). Todavia, não foi possível obter tal volume nessa configuração de experimento. Outras metodologias de análise de OG foram testadas para possível adaptação, porém sem sucesso. Acredita-se também que a metodologia Soxhlet seja mais eficiente quando o efluente apresentar concentrações maiores de OG.

Petry e Lettinga (1997) avaliaram a biodegradabilidade anaeróbia de uma emulsão de lipídeos obtida de gordura de leite e o surfactante sintético dodecilsulfato de sódio (SDS) em reator com lodo granular. Os resultados obtidos demonstraram que grande quantidade (70%) de lipídeos foi eliminada da fase líquida por adsorção no lodo. O material não adsorvido foi liquefeito e convertido a gás metano ou parte não foi biodegradado.

No presente trabalho, uma amostra de lodo anaeróbio de cada tratamento foi avaliada ao final da biodigestão para verificar a possível adsorção da gordura ao lodo. Entretanto, não foi detectada concentração de OG nesse material, portanto, indica que a gordura presente no efluente de abatedouro de aves foi degradada no processo.

Nesse sentido, Gomes et al. (2011) avaliaram a aplicação da enzima pancreatina suína no pré-tratamento de efluente sintético de laticínio, com posterior tratamento anaeróbio em reator UASB, e observaram que os lipídios foram completamente removidos do lodo anaeróbio utilizado como inóculo na biodigestão.

3.5.1.5 Produção de metano

A produção de metano foi avaliada diariamente pela medição dos volumes de NaOH deslocados dos eudiômetros. Na Figura 35 é apresentada a produção cumulativa de metano (CH_4) dentre os tratamentos para o período de biodigestão anaeróbia avaliado.

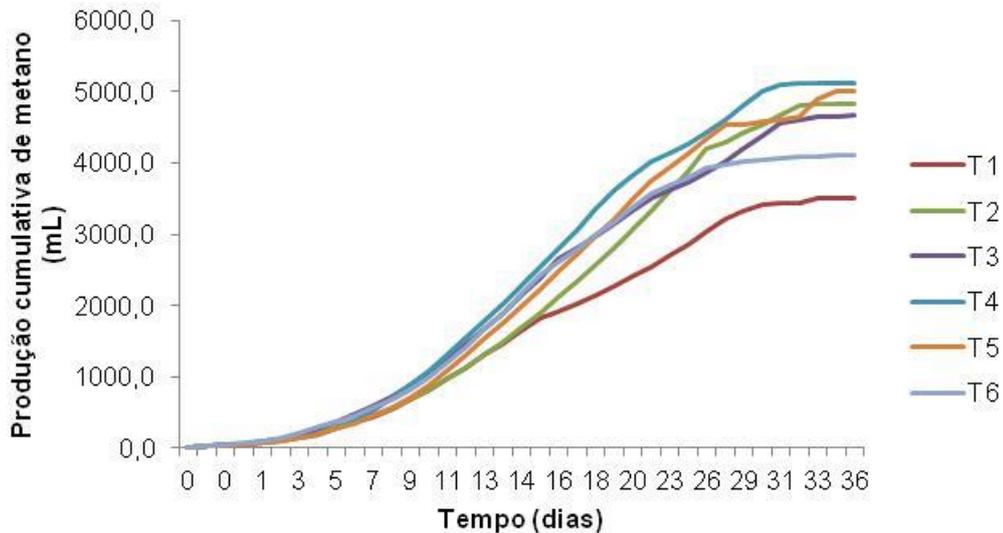


Figura 35 Produção cumulativa de metano obtida pela média de cada um dos tratamentos no decorrer do período de biodigestão anaeróbia.

Nos primeiros dias de incubação das amostras houve leve deslocamento da solução de NaOH dos eudiômetros. Essa se estendeu efetivamente até em torno do 25º dia de incubação, quando então os tratamentos começaram a apresentar tendência de estabilização da produção de metano. Os ensaios foram finalizados com 36 dias de incubação, quando se observou a estabilização por três dias consecutivos da produção de metano.

O volume final acumulado de metano para cada tratamento, ao final do processo de biodigestão, foi: T1 (controle) = 3500 mL; T2 = 4822 mL; T3 = 4665 mL; T4 = 5130 mL; T5 = 5020 mL; T6 = 4115 mL, uma vez que o tratamento T1, o qual não possuía surfactina, apresentou o menor volume final de produção de metano. Essa talvez seja uma evidência que o biossurfactante possa ter promovido efeito sobre o consórcio microbiano.

Valladão et al. (2007) observaram que o pré-tratamento de efluente de abatedouro de aves com um *pool* de hidrolases obtidas de fungos aumentou a produção de metano, diminui o tempo e o volume de reação dos reatores.

Ao comparar-se a produção acumulada de metano com os dados de remoção da DQOs e OG, para esse período (36 dias), já havia ocorrido remoção de mais de 80% da DQOs e acima de 90% dos OG das amostras destrutivas, réplicas dos tratamentos aplicados aos eudiômetros. Não havia, portanto, elevada concentração de material orgânico a ser degradado e convertido em biogás.

Na Figura 36 é apresentada a Atividade Metanogênica Específica (AME) obtida da média de cada um dos tratamentos no decorrer do período de biodigestão anaeróbia.

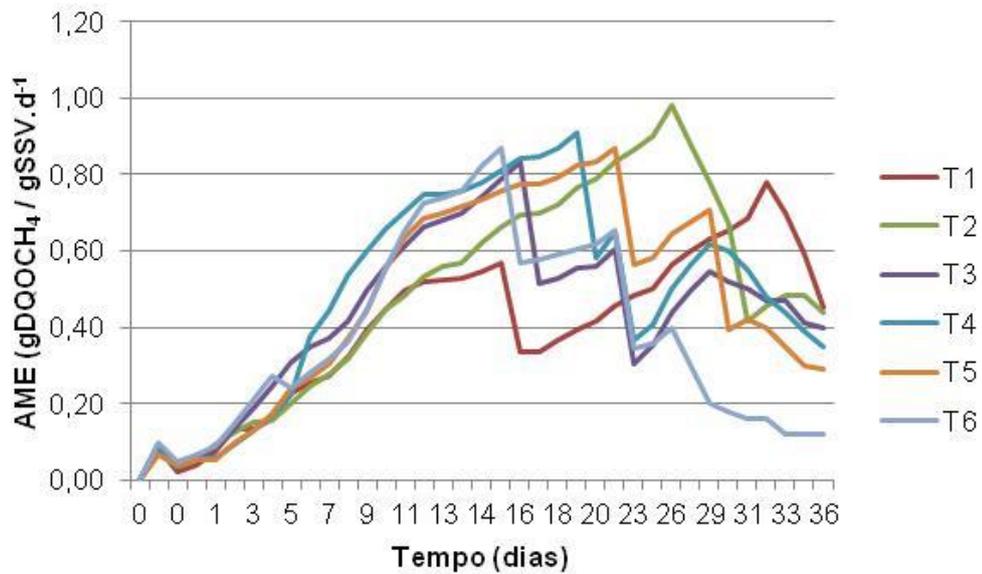


Figura 36 Atividade metanogênica específica obtida pela média de cada um dos tratamentos no decorrer do período de biodigestão anaeróbia.

Em média, a AME apresentada pelos tratamentos foi: Controle T1 = 0,78; T2 = 0,98; T3 = 0,83; T4 = 0,91; T5 = 0,87; T6 = 0,87 gDQOCH₄ / gSSV.d⁻¹.

Foi realizada a ANOVA que está apresentada na Tabela 25 com os valores máximos de AME apresentados por cada uma das réplicas dos tratamentos.

Tabela 25 Análise de variância dos máximos valores de AME apresentados pelos tratamentos aplicados nos eudiômetros.

Fonte variação	GL	SQ	QM	F	p-valor
Tratamento	5	0,06769	0,01354	1,739	0,200191
Erro	12	0,09340	0,00778		
Total	17				

Nível de significância: 5%.

O p-valor e o F calculado obtidos demonstram que não há diferença estatística entre os máximos valores da AME dos tratamentos aplicados. Ou seja, com 5% de significância, o valor máximo obtido da AME é estatisticamente igual entre todos os tratamentos.

Tais resultados demonstram que a aplicação do biossurfactante surfactina acima da sua CMC não inibiu a atividade microbiana, principalmente das arqueas metanogênicas. Entretanto, esses não foram os resultados observados por Damasceno et al. (2013), em que a adição de um biossurfactante do tipo ramnolípido acima da CMC e *pool* enzimático reduziram a produção específica de metano na biodigestão anaeróbia de efluente de abatedouro de aves.

3.5.1.6 Perfil dos ácidos orgânicos voláteis

As médias de concentração dos Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV) (acético, propiônico e butírico) durante os ensaios de biodigestão anaeróbia para cada um dos tratamentos aplicados são apresentadas a seguir. Foram utilizados os dados das amostras destrutivas para a construção dos gráficos.

Na Figura 37 é apresentado o comportamento do ácido acético.

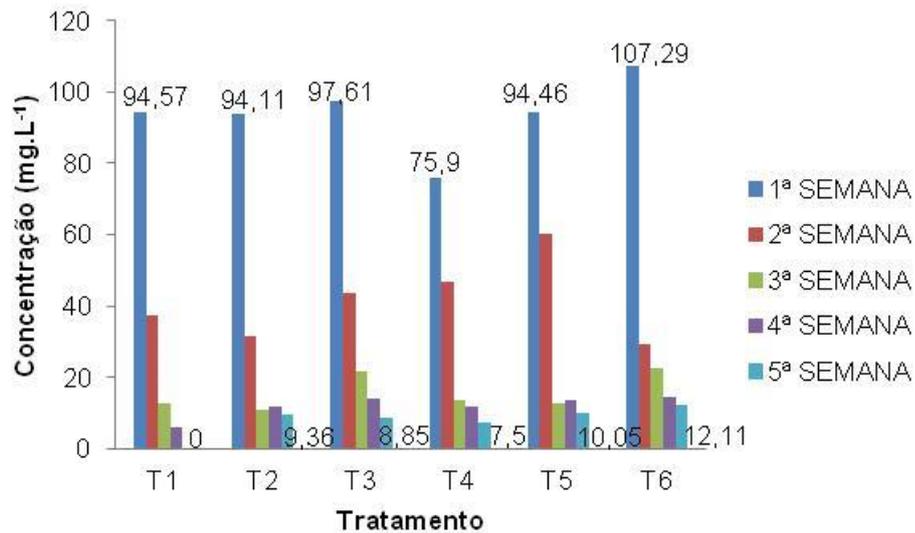


Figura 37 Comportamento do ácido acético no decorrer das cinco semanas de biodigestão anaeróbia dentre os tratamentos aplicados.

No presente trabalho foi observado que o ácido acético esteve em maior concentração na primeira semana de biodigestão e verificou-se a sua redução no decorrer do tratamento anaeróbio. As concentrações iniciais do ácido variaram de 75,09 a 107,29 mg.L⁻¹.

As porcentagens de redução nas concentrações de ácido acético entre os tratamentos do início ao final do processo foram: T1 = 100%; T2 = 90,05%; T3 = 90,93%; T4 = 90,11%; T5 = 89,36%; T6 = 88,71%.

O ácido acético é o mais importante e aquele que mais prevalece entre as formas dos ácidos voláteis que interferem na digestão anaeróbia e na produção de gás, pois pode ser formado diretamente pela fermentação de carboidratos, proteínas e lipídeos e é o intermediário metabólico que é convertido em CH₄ e CO₂ (Mc CARTY; JERIS; MURDOCH 1963).

Tais resultados também contribuem para visualizar o comportamento do processo anaeróbio desenvolvido. Observa-se que a partir da quarta semana de biodigestão as concentrações do ácido diminuíram, juntamente com a DQOs, estabilização da produção acumulada de metano e diminuição da AME.

Provavelmente, o ácido acético esteve presente em maior concentração que os outros ácidos, pois a conversão da glicose em ácido acético ocorre preferencialmente, devido ao fato dessa reação fornecer às bactérias acidogênicas um rendimento de energia maior para o crescimento, além de ser um substrato para o grupo de arqueas metanogênicas acetoclásticas que atuam na etapa posterior, para assim produzir metano (SHIDA, 2008).

Na Figura 38 é apresentado o comportamento do ácido propiônico.

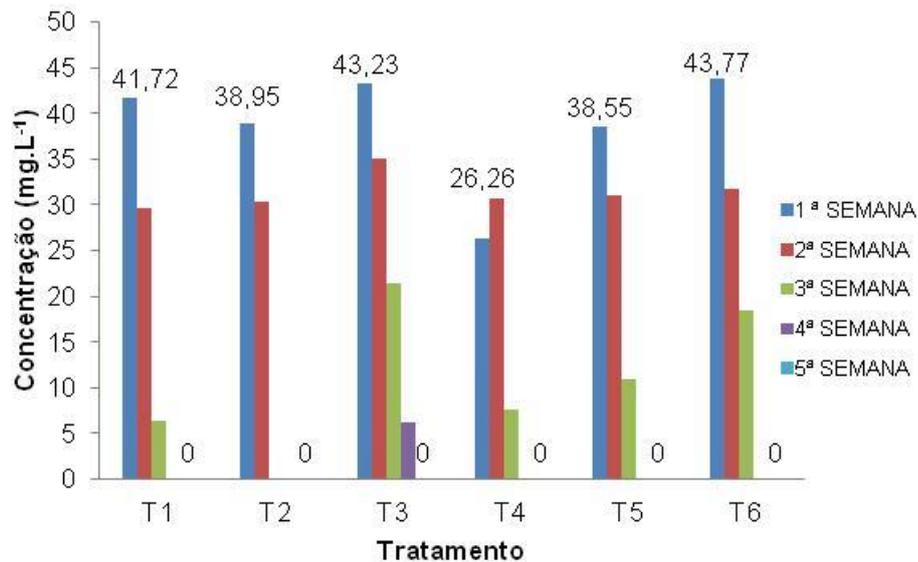


Figura 38 Comportamento do ácido propiônico no decorrer das cinco semanas de biodigestão anaeróbia dentre os tratamentos aplicados.

O ácido propiônico, assim como o acético, também esteve em maior concentração na primeira semana de biodigestão e verificou-se a redução do mesmo no decorrer do tratamento anaeróbio. As concentrações iniciais desse ácido variaram de 26,26 a 43,77 mg.L⁻¹, e houve completa transformação do ácido propiônico até o final da quarta semana de biodigestão para todos os tratamentos.

O ácido propiônico é formado pela fermentação metanogênica de carboidratos e proteínas. No reator, as bactérias acetogênicas transformam o ácido propiônico e o etanol em ácido acético e hidrogênio, enquanto as bactérias metanogênicas hidrogenotróficas utilizam hidrogênio e gás carbônico para produzir metano (ENCINA; HIDALGO, 2005).

Na Figura 39 é apresentado o comportamento do ácido butírico.

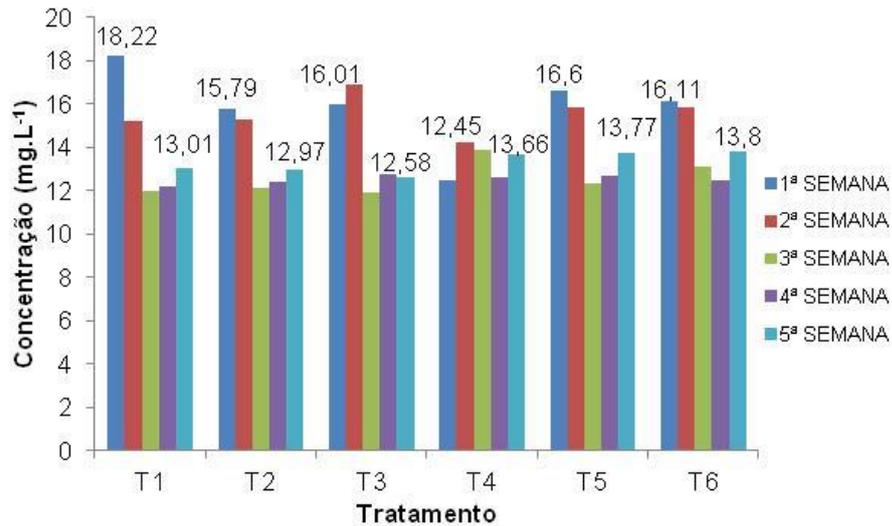


Figura 39 Comportamento do ácido butírico no decorrer das cinco semanas de biodigestão anaeróbia dentre os tratamentos aplicados.

O ácido butírico é formado a partir de proteínas e lipídeos (Mc Carty; Jeris; MurdochH, 1963), e, para esse trabalho, a sua concentração inicial variou entre os tratamentos de 12,45 a 18,22 mg.L⁻¹ e concentração final de 12,58 a 13,8 mg.L⁻¹.

O ácido butírico permaneceu nos reatores no decorrer das cinco semanas de biodigestão anaeróbia, e houve redução na concentração desse para os tratamentos: T1 = 28,60%; T2 = 28,81%; T3 = 21,34%; T5 = 17,04% e T6 = 14,33%. Somente para o T4 houve aumento na concentração na ordem de 9,71% do início para o final da biodigestão.

O ácido láctico também foi avaliado nas amostras, entretanto, seus resultados não foram apresentados no trabalho porque, além das concentrações obtidas terem sido muito baixas, não houve reprodutibilidade entre as réplicas, nem houve coerência de dados. Isso pode ter ocorrido devido a uma provável baixa pressão de H₂ no sistema. Nessa condição, a formação de compostos orgânicos como acetato, CO₂ e H₂ é termodinamicamente favorecida, enquanto na condição de pressão parcial de H₂ em níveis elevados, ocorre somente a formação de produtos como propionato e alguns outros ácidos orgânicos, lactato e etanol (CARON et al., 2009).

3.5.2 Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas do lodo anaeróbio bruto e dos lodos utilizados como inóculo nos tratamentos aplicados.

3.5.2.1 Hibridização *In Situ* com Sondas Fluorescentes (FISH)

Os resultados das análises de FISH com a biomassa do lodo anaeróbio antes e após o tratamento do efluente estão apresentados nesta seção. A primeira imagem de cada Figura da seção refere-se ao corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (imagens em azul). A segunda imagem refere-se às sondas específicas (imagens em vermelho).

O corante DAPI é amplamente utilizado na microscopia de fluorescência; é também um corante fluorescente que se liga fortemente aos ácidos nucleicos e promove a coloração de qualquer organismo presente na amostra. A sonda EUB hibridiza especificamente no ácido nucleico (DNA, RNA ou RNAr) de bactérias do Domínio *Bacteria*, enquanto a sonda ARC hibridiza especificamente no ácido nucléico de bactérias do Domínio *Archaea*.

Na Figura 40 (A a G) são apresentadas algumas morfologias observadas na microscopia de epifluorescência com FISH para a sonda EUB338 I, II e III.

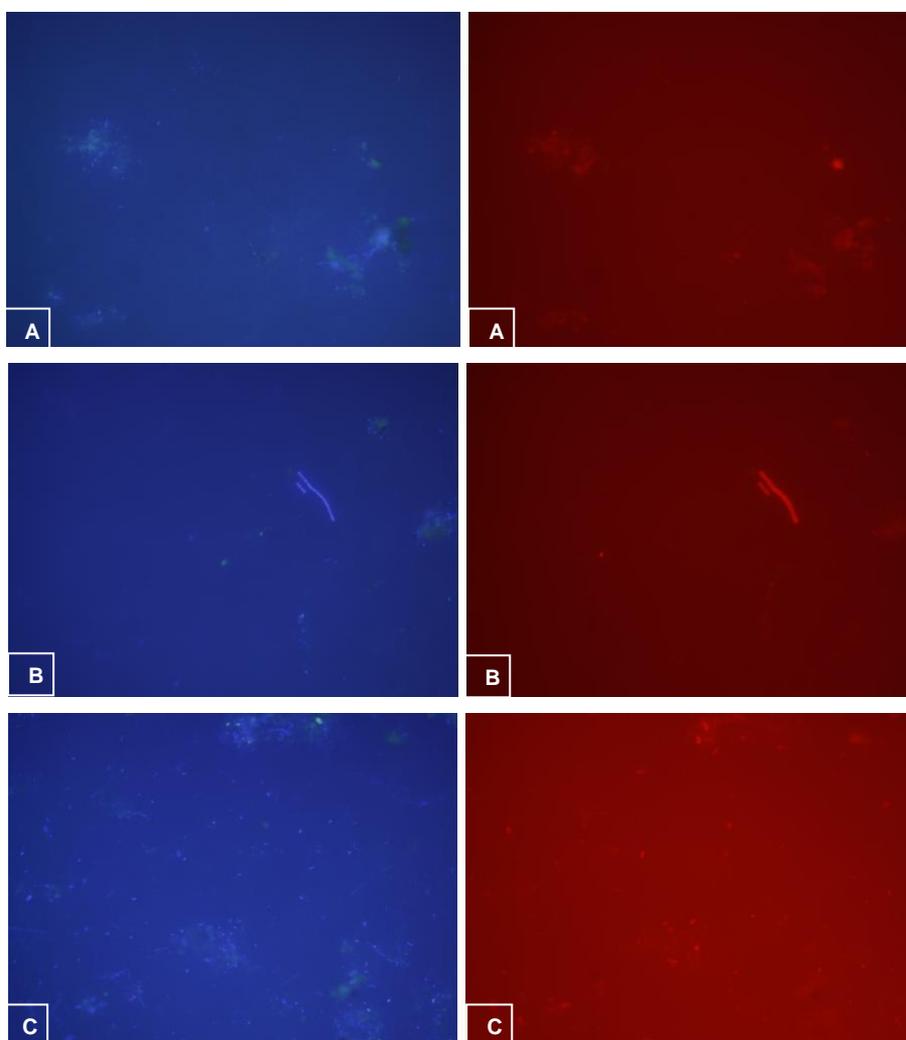


Figura 40 Morfologia de microrganismos sob epifluorescência, observados em corante DAPI (azul) e com a sonda EUB338 (vermelho) para as amostras: (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.

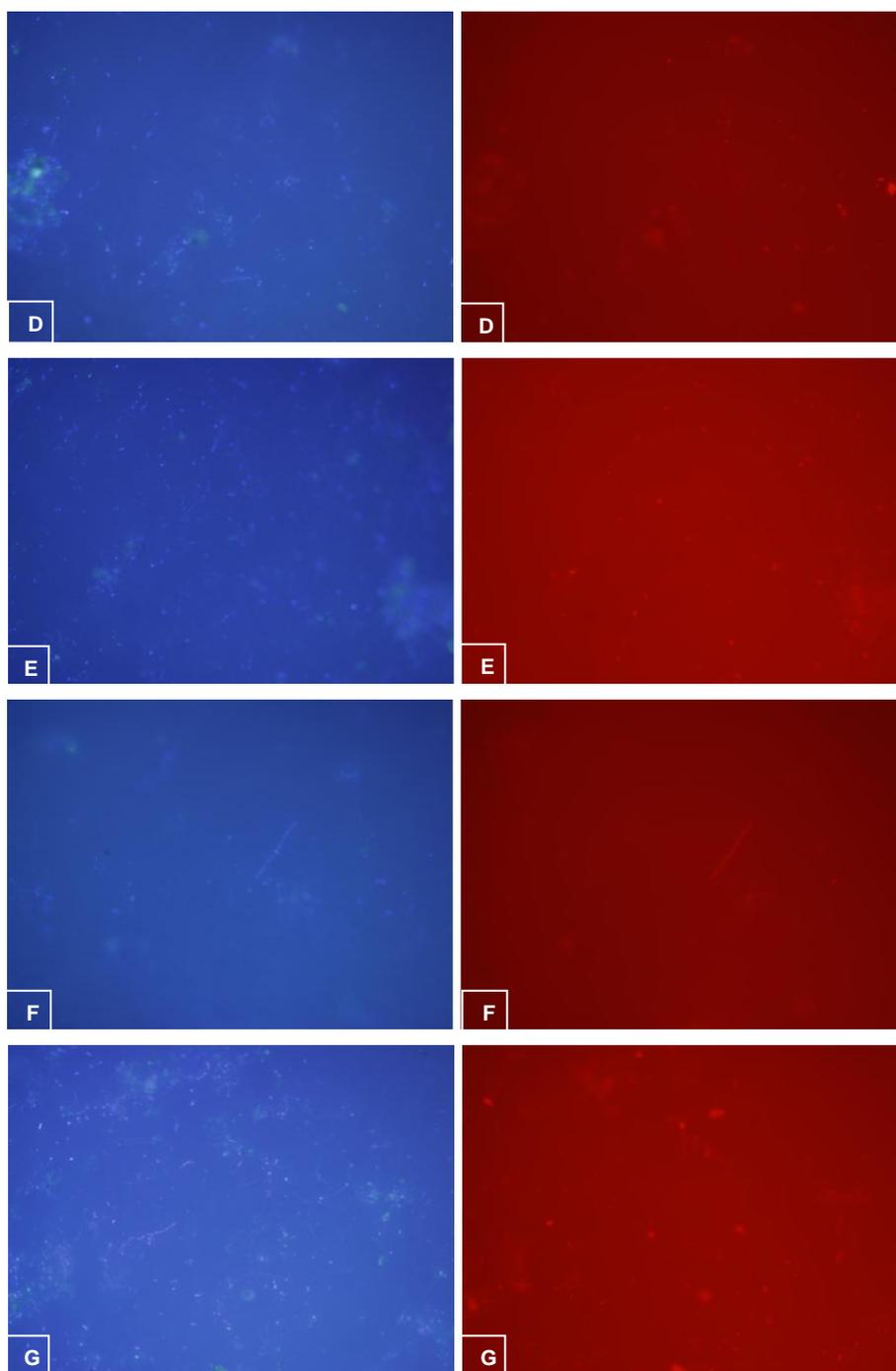


Figura 40 (continuação) Morfologia de microrganismos sob epifluorescência, observados em corante DAPI (azul) e com a sonda EUB338 (vermelho) para as amostras: (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.

Procurou-se obter as fotografias de regiões das lâminas onde não fosse elevada a presença de grânulos de lodo, mas, conforme observado na Figura 42A, referente à caracterização do lodo anaeróbico bruto, é possível observar nas imagens o emaranhado de matéria orgânica e colônias de microrganismos.

Para todas as amostras analisadas, observou-se uma grande diversidade de microrganismos com morfologias de cocos, bacilos, filamentos e agrupamentos de cocos (sarcinas). Na Figura 42B, referente ao tratamento 1, observou-se a presença marcante de

um bacilo com extremidade arredondada, enquanto na Figura 42F, referente ao tratamento 4, observou-se a presença de filamento septado, características de organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*.

Hirasawa (2007) também verificou tais características no lodo anaeróbio utilizado como inóculo em seu trabalho que tinha como objetivo avaliar a metanogênese e sulfetogênese em um reator UASB, sob diferentes relações etanol/sulfato. Esse autor descreve ainda a importância da observação *in situ* das amostras biológicas utilizadas como inóculo, para se decidir na escolha de sondas ou *primers* específicos a serem aplicados nas análises por técnicas de biologia molecular.

Algumas morfologias observadas na microscopia de epifluorescência com FISH para a sonda ARC 915 estão apresentadas na Figura 41 (A a G).

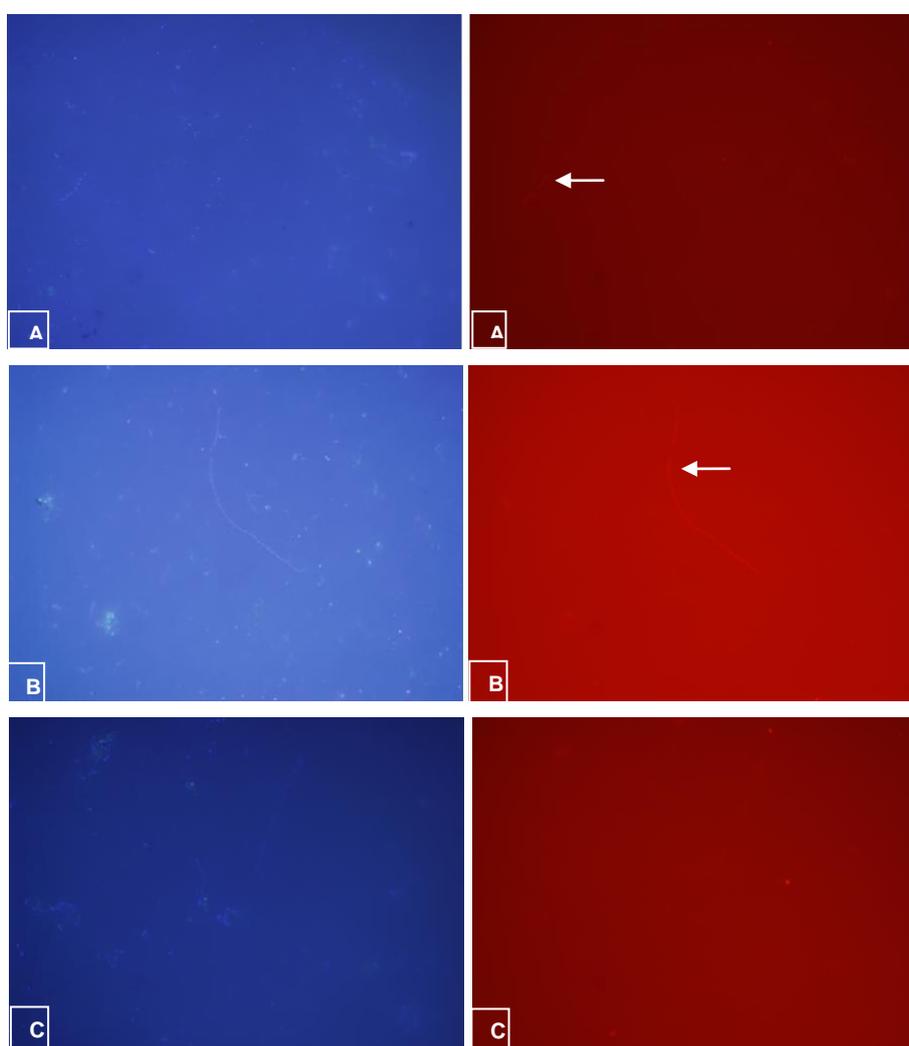


Figura 41 Morfologia de microrganismos sob epifluorescência, observados em corante DAPI (azul) e com a sonda ARC915 (vermelho) para as amostras: (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.

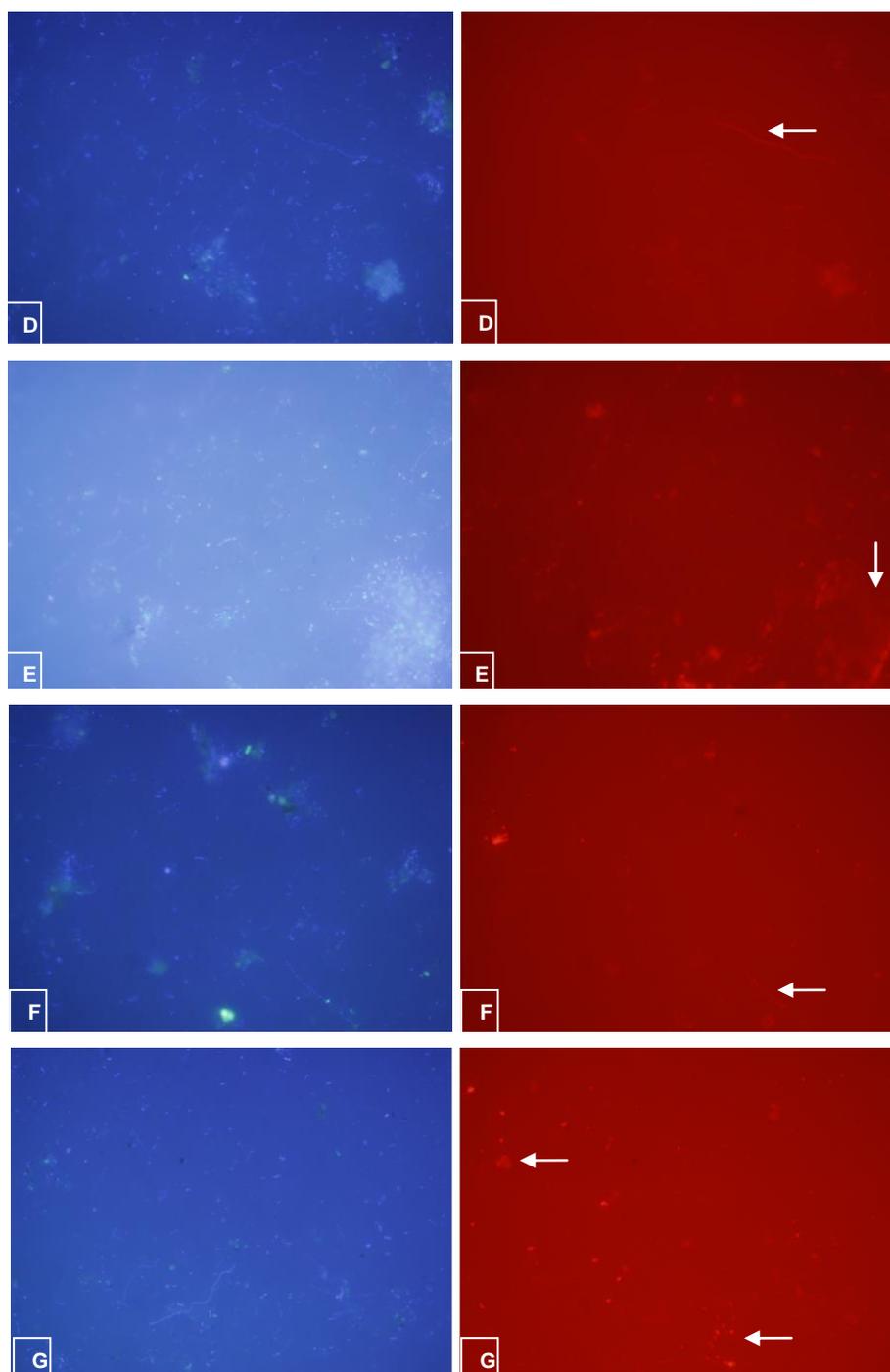


Figura 41 (continuação) Morfologia de microrganismos sob epifluorescência, observados em corante DAPI (azul) e com a sonda ARC915 (vermelho) para as amostras: (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.

Foi possível detectar a presença de DNA de bactérias arqueas em todas as amostras analisadas, e foram consideradas metanogênicas, pois, de acordo com Raskin et al. (1995), parte-se do pressuposto de que as condições ambientais dos reatores e digestores anaeróbios não favorecem o crescimento de outras que não sejam metanogênicas.

Microrganismos semelhantes às bactérias do gênero *Methanosaeta* estiveram presentes em quase todas as amostras. Tal gênero é constituído por espécies que formam

filamentos longos e finos, importantes na formação da trama microbiana presente nos grânulos de reatores anaeróbios. Tais microrganismos têm elevada afinidade pelo acetato, mas uma taxa de crescimento específico, relativamente baixa (tempo de duplicação celular de 3,5 a 9 dias) (JETTEN et al., 1992).

Também foi possível observar a presença de microrganismos semelhantes às bactérias do gênero *Methanosarcina*, as quais formam cocos que se agregam e formam “pacotes”, e são generalistas (seus membros podem apresentar os três tipos de metabolismo). Têm taxa de crescimento específico maior (24 horas de tempo de duplicação celular), quando comparada ao da *Methanosaeta*, entretanto, apresenta baixa afinidade pelo acetato (JETTEN et al., 1992).

Abreu (2007) avaliou a diversidade microbiana do lodo anaeróbio de dois reatores UASB com peneiramento forçado e duas velocidades ascensionais. As análises de FISH com a sonda ARC915 revelaram quatro tipos morfológicos diferentes: dois similares às metanogênicas acetoclásticas típicas (filamentos do gênero *Methanosaeta* e agregados de cocos do gênero *Methanosarcina*) e outros dois filamentos, diferentes dos de *Methanosaeta*, provavelmente relacionados às metanogênicas hidrogenotróficas. O morfotipo de *Methanosaeta* foi o mais observado e compreende de 63 a 87% do total de arqueas. A autora conclui que ambos reatores apresentavam uma comunidade de arqueas similar, constituída principalmente por filamentos típicos de *Methanosaeta*. Assim, confirmam-se a importância e a predominância desse grupo microbiano na cadeia final de degradação anaeróbia em reatores anaeróbios.

É bem provável que nesse estudo, assim como no apresentado por Hirasawa (2007), a metanogênese tenha sido favorecida pelo predomínio de arqueas acetoclásticas, especificamente *Methanosaeta* sp., proveniente do inóculo (lodo) predominantemente metanogênico a partir da redução do acetato.

No presente trabalho não foram observados organismos redutores de sulfato (SRB) nas amostras com sonda específica, ou essas podem ter se apresentado em concentrações muito baixas, nas quais não foram possíveis de detecção pela técnica empregada. Possivelmente, as metanogênicas consumiram o acetato proveniente da degradação de etanol e foram mais favoráveis em relação às SRB nas condições empregadas no experimento.

3.5.2.2 Coloração de Gram

Os resultados obtidos com as amostras coradas com a técnica de Gram são apresentados nesta seção. Na Figura 50 estão apresentadas as imagens obtidas na caracterização do lodo anaeróbio de biodigestor de fecularia.

Na Figura 42 (A a G) estão algumas morfologias observadas na microscopia em coloração de Gram.

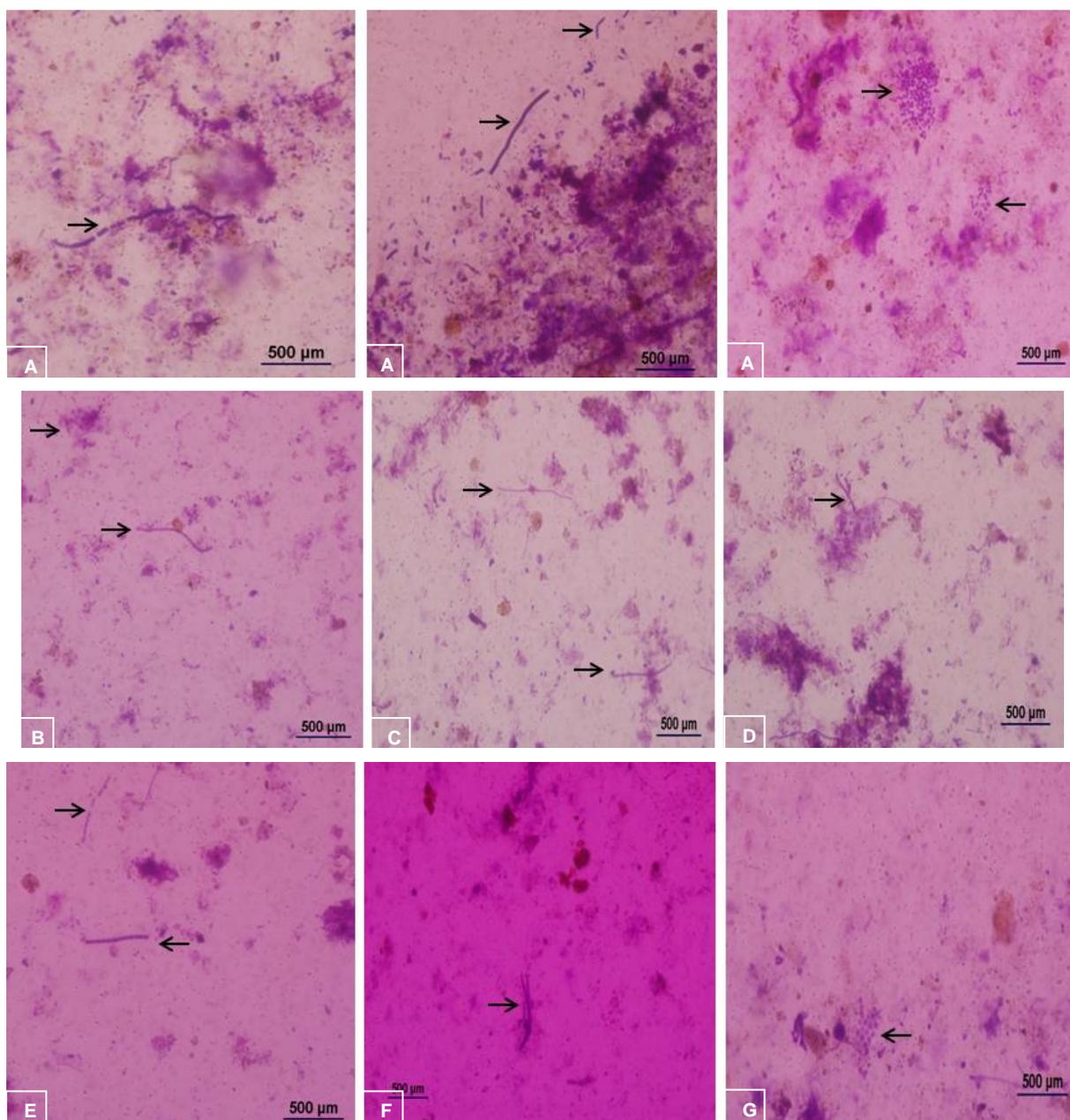


Figura 42 Morfologia de microrganismos observados em coloração de Gram. (A) Lodo bruto; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3; (E) Tratamento 4; (F) Tratamento 5; (G) Tratamento 6.

A coloração de Gram permitiu observar que, no lodo anaeróbio, há a presença em maior evidência de microrganismos gram-positivos (coloração roxa) do que de organismos gram-negativos (coloração rosa).

De acordo com Madigan et al. (2010), a maioria das bactérias acetogênicas que produzem e excretam acetato no metabolismo anaeróbio é gram-positiva e pertence ao Domínio *Bacteria*. Árqueas metanogênicas do gênero *Methanosaeta* também são gram-positivas.

A coloração de Gram ressaltou a morfologia dos microrganismos e permitiu melhor visualização dos gêneros bacterianos presentes nas amostras. Em todos os tratamentos aplicados, foi possível observar a riqueza na biodiversidade microbiana do lodo anaeróbio dos tratamentos, com a presença de filamentos contínuos e septados, cocos, bacilos e sarcinas.

3.6 CONCLUSÕES

A biodigestão anaeróbia é um tratamento que já é empregado para efluentes agroindustriais, e, na presente pesquisa, confirmou-se sua viabilidade para o tratamento de efluente de abatedouro de aves, além de ocorrer a produção de metano no biogás.

O acompanhamento dos ensaios, a partir de amostras destrutivas, permitiu observar o desenvolvimento temporal dos parâmetros de controle diretamente envolvidos na biodigestão anaeróbia, e constatar que o processo se desenvolveu adequadamente.

A remoção da matéria orgânica solúvel do efluente apresentou-se estatisticamente igual entre os tratamentos aplicados.

Possivelmente, os óleos e graxas presentes podem ter sido mais efetivamente disponibilizados e solubilizados com o efeito da temperatura sobre os constituintes do efluente ao invés de uma ação direta do biossurfactante na etapa de pré-tratamento.

O volume acumulado de metano ao final do experimento para o tratamento controle, em que não houve a adição de surfactina no pré-tratamento, foi o menor observado entre os tratamentos.

Pelas análises microbiológicas de FISH e coloração de Gram, foi possível observar que o biossurfactante surfactina não inibiu o aparecimento dos gêneros bacterianos comumente presentes em tratamentos anaeróbios de efluentes, e apresentou, em todos os tratamentos, grande riqueza de espécies microbianas.

3.7 REFERÊNCIAS

ABREU, A. A. V. **Identificação de bactérias filamentosas em processos de lamas ativadas através da técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH)**. 2004. 142 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho. Braga, 2004.

ABREU, É. F. de. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio ambiente e Recursos hídricos). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007.

ALBERTON, D. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios**. 2009. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências: Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

AL-MUTAIRI, N. Z.; AL-SHARIFI, F. A.; AL-SHAMMARI, S. B. Evaluation study of a slaughterhouse wastewater treatment plant including contact-assisted activated sludge and DAF. **Desalination**, v. 225, p. 167-175, 2008.

ALVES, M. M.; PEREIRA, M. A.; SOUZA, D. Z.; CAVALEIRO, A. J.; PICAVET, M.; SMIDT, H.; STAMS, A. J. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). **Microbial Biotechnology**, v. 2, v.5, p. 538-550, 2009.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANDERSON, K.; SALLIS, P.; UYANIK, S. **Anaerobic treatment processes**. In: MARA, D.; HORAN, N.(Eds.). Handbook of water and wastewater microbiology. University of Leeds, UK: Academic Press, 2003, p. 391 .

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 117-129, 2004.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington, DC: APHA 2005.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: Causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F. DOS.; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Cassava wastewater (manipueira) treatment using a two-phase anaerobic digester. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, 2000.

BATIMELLI, A.; CARRÈRE, H.; DELGENÈS, J. P. Saponification of fatty slaughterhouse wastes for enhancing anaerobic biodegradability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3695-3700, 2009.

CAIXETA, E. T.; CAMMAROTA, M. C.; XAVIER, A. M. F. Slaughterhouse wastewater treatment: evaluation of a new three-phase separation system in a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 61-69, 2002.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CAMEOTRA; S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin/Heidelberg, v. 50, p-520-529, 1998.

CARON, F. C.; MESSIAS, J. N.; COUTINHO FILHO, J. S. RUSSI, J. C. V.; WEBER, M. I. Geração de energia no campus a partir da biodigestão anaeróbica. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, n. 42, p. 63-73, Curitiba, 2009.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias** – Volume 5. 10ª Ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG. Belo Horizonte. 1997.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios – edição revisada e ampliada**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG. Belo Horizonte. 2007. 379 p.

CHIPASA, K. B.; MEDRZYCKA, K. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 635–645, 2006.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 13/12/2014.

CORREIA, G. T.; DEL BIANCHI, V. L. Tratamento biológico de água residuária da produção de farinha de mandioca utilizando reator anaeróbico compartimentado vertical (RACOV). **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 159-166, 2008.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Pretreatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 720-728, 2011.

DEL NERY, V.; DE NARDI, I. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; POZZI, E.; AMORIM, A. K. B.; ZAIAT, M. Long-term operating performance of a poultry slaughterhouse wastewater treatment plant. **Resource, Conservation and Recycle**, v. 50, n. 1, p. 102-114, 2007.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T.T. **Anaerobic treatment of dairy wastewaters: A review**. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 8, p. 2583-2595, 2005.

DOMINGUES, M. R. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2001.

DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J. F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research**, v. 39, p. 2207-2218, 2005.

ENCINA, P. A.; HIDALGO, M. D. Influence of substrate feed patterns on biofilm development in anaerobic fluidized bed reactors (AFBR). **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2509–2516, 2005.

GALLERT, C.; WINTER, J. Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. In: JÖRDENING, H. J.; WINTER, J. **Environmental Biotechnology**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, 2005. p. 20-21.

HIRASAWA, J. S. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de Biologia Molecular**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, 2007.

ISLAS, D. J.; MORENO, M.; RODRÍGUEZ, J. N. G. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, Coyoacán, v. 26, n.1, p. 68-84, 2010.

JACOBUCCI, D. F. C.; ORIANI, M. R. G.; DURRANT, L. R. Reducing COD level on oily effluent by utilizing biosurfactant-producing bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1037-1042, 2009.

JETTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. **FEMS Microbiology Reviews**, 88, p. 181-198, 1992.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Impact of enzymatic pre hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, p. 1797-1802, 2002.

KEEFER, C.; E.; URTES, H.; C. Digestion of volatile acids. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 34, n. 6, p. 592-604, 1962.

LAZARO, C. Z. **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas consumidoras de ácidos orgânicos visando a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de batelada**. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil: Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo. São Carlos, 2009.

LEAL, M. C. C. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.

LEITE, V. D.; LOPES, W. S.; SOUSA, J. T.; PRASAD, S. Tratamento anaeróbio de resíduos orgânicos com baixa concentração de sólidos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 280-284, 2004.

LEITE, T. L. **Produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Ed. Artmed, 2010.

MAGALHÃES, E. M.; et al. Confecção e avaliação de um sistema de remoção do CO₂ contido no biogás. **Acta Scientiarum Technology**, v. 26, n. 1, p. 11-19, 2004.

Mc. CARTY, P. L.; JERIS, J. S.; MURDOCH, W. Individual volatile acids in anaerobic treatment. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 35, n. 12, p. 1501-1516, 1963.

MIQUELETO, A. P. **Comportamento de reator anaeróbio operado em batelada sequencial, contendo biomassa imobilizada e submetido a aumento progressivo da**

- concentração de substrato de fácil degradação.** 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil: Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo. São Carlos, 2003.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. DE.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JUNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. DE. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 185-190, 2006.
- MORAES, L. M.; PAULA JUNIOR, D. R. Gerenciamento de resíduos de abatedouros de aves: Alternativas de manejo e tratamento. In: 20º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. 019, 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: ABES, 1999. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/brasil20/iii-019.pdf>>. Acesso em: 16/08/2012.
- MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.
- NARDI, I. R.; FUZI, T. P.; DEL NERY, V. Performance evaluation and operating strategies of dissolved-air flotation system treating poultry slaughterhouse wastewater. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 52, p. 3, p. 533-544, 2008.
- NISHIO, S. R. **Avaliação da comunidade microbiana procarionte através de técnicas moleculares – FISH, PCR/DGGE e sequenciamento em sistemas artificiais de redução de cargas: ênfase ao estudo de lagoa de estabilização facultativa.** 2010. 38 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo: 2010.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p 252-259, 2007.
- OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANONNI, S. J.; PACE, N. R. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. **Annual Reviews of Microbiology**, n. 40, p. 337-365, 1986.
- PETRUY, R.; LETTINGA, G. Digestion of a milk-fat emulsion. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 141-149, 1997.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R.; **Microbiologia prática: Roteiro e Manual.** Ed. Atheneu, 1993, p. 5-8.
- RASKIN, L.; ZHENG, D.; GRIFFIN, M. E.; STROOT, P. G.; MISTA, P. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 297-308, 1995.
- ROSA, D. R.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M.; FREIRE, D. M. G. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6170-6176, 2009.
- SARACHAT, T.; PORNUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas*

aeruginosa SP4 using foam fractionation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 324-330, 2010.

SHIDA, G. M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidizado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). 121 f. 2008. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SILVA, J. N.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Application of home-made enzyme and biosurfactant in the anaerobic treatment of effluent with high fat content. **Bioprocessing and Biotechniques**, v. 3, n. 3, 2013.

STEIL, L. **Avaliação da atividade microbiana anaeróbia metanogênica na lagoa de estabilização anaeróbia da estação de tratamento de esgotos sanitários do município de Cajati, Vale do Ribeira do Iguape, estado de São Paulo**. 2007, 291 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SOSA, R.; CHAO, R.; RÍO, DEL J. **Aspectos Bioquímicos y Tecnológicos del Tratamiento de Residuales Agrícolas con Producción de Biogás**. 2004. Disponível em: <<http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/rccpn/rev62/RCP62art1.htm>>. Acesso em: 12/12/2014.

SUÁREZ, A. G.; SALCEDO, Y. G.; GUTIÉRREZ, C. M.; REYES, I. P. Estimulación del proceso de digestión anaerobia mediante la adición de minerales cubanos. In: 16^o CONVENCIÓN CIENTÍFICA DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA. 2012. Havana, Cuba. **Anais eletrônicos...** Havana: CUJAE, 2012. Disponível em: <redma.cujae.edu.cu/infusions/pro.../file.php?...>. Acesso em: 13/12/2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Ed. Artmed, 8^a ed. 2005.

VALLADÃO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, p. 219-225, 2007.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 232-239, 2000.

ZHANG, H.; XIANG, H.; ZHANG, G.; CAO, X.; MENG, Q. Enhanced treatment of waste frying oil in an activated sludge system by addition of crude rhamnolipid solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1-3, p. 217-223, 2009.

ZENATTI, D. Tratamento e aproveitamento de resíduos da produção do biodiesel: água residuária e glicerol. 128 f. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

A surfactina obtida do cultivo de *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira, utilizada nesse trabalho, apresentou características essenciais de um excelente surfactante, tais como: bom índice de emulsificação, manutenção da estabilidade das emulsões obtidas com os óleos e hidrocarbonetos após 72 horas e Concentração Micelar Crítica (CMC) adequada, que permite a redução da tensão superficial de forma eficiente.

Observou-se que a surfactina não inibiu a comunidade microbiana presente no lodo anaeróbio, e, com isso, conclui-se que esse biosurfactante pode ser aplicado na área ambiental, como na de tratamento de efluentes.

Durante os ensaios de pré-tratamento do efluente de abatedouro de aves com surfactina nas concentrações: 0, 6; 13,27; 31; 48,73 e 56 mg.L⁻¹, foi possível observar que o tempo de 4,5 horas é suficiente para solubilizar a Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQOs) em sua máxima concentração. Foi notório também que nas maiores temperaturas e concentrações de surfactina encontraram-se os maiores valores de aumento da solubilização da DQOs.

Na etapa de biodigestão anaeróbia do efluente pré-tratado, foi possível concluir que o efluente de abatedouro de aves é passível de biodigestão anaeróbia, com produção de metano no biogás. Entretanto, o volume acumulado de metano ao final do experimento para o tratamento controle, em que não houve a adição de surfactina no pré-tratamento, foi o menor observado entre os tratamentos.

A remoção da matéria orgânica solúvel na forma de DQOs apresentou-se estatisticamente igual entre os tratamentos aplicados. Os óleos e graxas (OG) podem ter sido disponibilizados com o efeito da temperatura sobre os constituintes do efluente ao invés de uma ação direta do biosurfactante na etapa de pré-tratamento, visto que no tratamento controle também foi observada remoção significativa de tal parâmetro.

O acompanhamento dos ensaios, por meio das amostras destrutivas, permitiu observar o desenvolvimento temporal dos parâmetros de controle diretamente envolvidos na biodigestão anaeróbia, e constatar que o processo se desenvolveu adequadamente.

Ainda, por análises microbiológicas de FISH e coloração de Gram, foi possível observar que o biosurfactante surfactina não inibiu o aparecimento dos gêneros bacterianos comumente presentes em tratamentos anaeróbios de efluentes, e apresentou grande riqueza de espécies microbianas em todos os tratamentos.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Sugere-se testar outras concentrações do biossurfactante surfactina no pré-tratamento do efluente;
- Avaliar efluentes que apresentem maior carga de OG para que, dessa forma, possam ser obtidos resultados mais expressivos;
- Avaliar e comparar os surfactantes sintéticos no tratamento de efluentes;
- Utilizar uma enzima lipolítica na etapa de pré-tratamento juntamente com o biossurfactante para verificar a ação conjunta de quebra e emulsificação da molécula de gordura.