

II-417 - TRATAMENTO BIOLÓGICO DE PRÉ HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EFLUENTE FRIGORÍFICO

Rodrigo Augusto Franco de Oliveira Zawadzki⁽¹⁾

Tecnólogo em Química Ambiental (UTFPR). Mestre em Química pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professor da Área de Saneamento e Meio Ambiente do SENAI da Cidade Industrial de Curitiba.

Marcelo Real Prado

Engenheiro Químico (UEM). Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professor do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da UTFPR.

Nádia Krieger

Licenciatura em Química (PUC PR). Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professora associada do Departamento de Química da UFPR.

Endereço⁽¹⁾: Rua Senador Accioly Filho, 298 – Cidade Industrial - Curitiba - PR - CEP: 81310-000 - Brasil - Tel: +55 (41) 3271-7100 - Fax: +55 (41) 3271-7103 - e-mail: rodrigo.zawadzki@pr.senai.br.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um processo contínuo de pré-hidrólise enzimática para o tratamento de um efluente com elevado teor lipídico. O efluente utilizado foi obtido de uma indústria frigorífica do município de São José dos Pinhais, PR. O sólido fermentado com atividade lipolítica utilizado para a pré-hidrólise dos lipídeos deste efluente foi produzido por fermentação no estado sólido, utilizando o fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. O tratamento enzimático foi realizado em um biorreator de leito fixo, preenchido com o sólido fermentado e alimentado com o efluente em fluxo ascendente. Um teste controle também foi realizado da mesma forma, porém, o sólido utilizado para preencher o biorreator neste teste não foi fermentado por *R. microsporus*. Os resultados mostraram que o tratamento enzimático em biorreator de leito fixo foi capaz de reduzir o teor de óleos e graxas (O&G) do efluente, onde foi observada uma eficiência entre 90% e 96% frente a 76% e 79% no controle. A redução do teor de O&G teve como consequência o aumento na biodegradabilidade do efluente, já que houve um acréscimo na razão DBO/DQO de 0,19 no efluente bruto para 0,55 no efluente tratado com 24 h de retenção no biorreator. A análise microbiológica do sólido fermentado contido no biorreator, após 101 dias de experimentos, revelou que o fungo encontrava-se viável, não tendo crescido praticamente nenhum outro microrganismo proveniente do efluente, mostrando que os resultados obtidos de remoção de O&G podem ser atribuídos à produção de lipases pelo microrganismo originalmente presente no sólido fermentado.

PALAVRAS-CHAVE: Tratamento enzimático, lipases, efluente frigorífico, óleos e graxas, biorreator de leito fixo.

INTRODUÇÃO

Efluentes com elevados teores de óleos e graxas (O&G) geralmente acima de 150 mg/L apresentam baixa biodegradabilidade, conceito ligado a quantidade relativa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) frente a Demanda Química de Oxigênio (DQO), ou seja, à razão DBO/DQO (Cammarota & Freire, 2006). Nestes efluentes, esta razão normalmente encontra-se abaixo de 0,25 (Von Sperling, 2005). Sendo assim, estes efluentes podem ocasionar problemas operacionais em sistemas biológicos de tratamento, principalmente devido à inibição do metabolismo microbiológico, colmatagem de reatores ou formação de lodo filamentoso. (Donkin, 1997; Vidal *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2003 e Cammarota & Freire, 2006). Tendo em vista esta problemática, a tecnologia enzimática tem no uso de lipases (triacil glicerol hidrolases 3.1.1.3) uma promissora técnica para remoção de O&G, já que são capazes de catalisar a quebra da ligação éster de lipídeos, formando gliceróis e ácidos graxos, que são mais facilmente absorvidos pelas células microbianas. A tecnologia enzimática, para este fim, ainda é limitada pelo alto custo de implementação (Li & Zong, 2010). Entretanto, a tecnologia da fermentação no estado sólido (FES) vem se mostrando economicamente mais viável às indústrias, especialmente quando são utilizados resíduos agroindustriais como substratos (Castilho *et al.* 2000; Sun & Xu, 2008 e Li & Zong, 2010). Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um tratamento enzimático de pré-hidrólise de um efluente de frigorífico (com teor de O&G de aprox. 600 mg/L). Para isto, foi

construído um biorreator de leito fixo, de fluxo ascendente contínuo e preenchido com o sólido fermentado com atividade lipolítica produzida por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do sólido fermentado

O sólido fermentado com atividade lipolítica utilizado no bioreator de leito fixo foi produzido por FES, a partir de uma mistura 3:1 de bagaço de cana de açúcar e farelo de girassol, fermentado por *R. microsporus*, conforme metodologia otimizada por Alberton *et al.* (2010). Após produção do sólido fermentado, este foi armazenado em sacos plásticos e congelados a -18°C .

Medição da atividade de lipase do sólido fermentado

Para determinação da atividade lipolítica, uma massa de aproximadamente 85 mg do sólido fermentado foi adicionado a 20 mL de uma emulsão contendo: tampão Tris-HCl 2,5 mmol/L, goma arábica 3% m/v, CaCl_2 2 mmol/L, NaCl 150 mmol/L e tricaprilina 63 mmol/L. Estas determinações foram realizadas em equipamento do tipo pH Stat (718 Stat Titrimo, Metrohm) ajustado para titular por 10 min em pH 7,0. Uma unidade de atividade enzimática (U) é equivalente a 1 μmol de ácido graxo produzido por minuto. Nestes ensaios, a atividade enzimática foi medida em unidades de atividade por massa de sólido seco (U/g SS).

Coleta e caracterização do efluente de frigorífico

O efluente utilizado no tratamento enzimático foi coletado em um frigorífico em São José dos Pinhais, PR. Este frigorífico não possui abatedouros na planta onde o efluente foi coletado, realizando somente o processamento de carnes e derivados para produção de salsichas e embutidos em geral. O volume de efluente bruto coletado após a peneira estática foi de 500 L, transferido para dentro de um tambor plástico. Em seguida, o efluente foi homogeneizado dentro do tambor e distribuído para bombonas plásticas de 35 L. As bombonas contendo o efluente foram então armazenadas em um congelador a -18°C . As análises do efluente bruto foram realizadas em triplicatas, conforme Standard Methods 21ª edição.

Montagem do Biorreator de Leito Fixo

O biorreator de leito fixo foi construído em escala piloto, com 92 cm de altura útil (para o leito fixo), 10 cm de diâmetro e vazão de entrada regulável (através de uma bomba peristáltica) entre 1,0 a 5,0 mL/min, conforme Figura 1. A aeração do biorreator foi fornecida por um aerador de aquário, e um recipiente de vidro com um agitador magnético foi utilizado para alimentação do efluente no biorreator. Para o preenchimento do leito fixo foi utilizado 1,25 kg de sólido fermentado.

Tratamento enzimático do efluente frigorífico

Após o empacotamento do leito fixo do biorreator com o sólido fermentado, iniciou-se o tratamento enzimático de pré-hidrólise do efluente frigorífico. Para isso, diariamente alimentou-se o recipiente de vidro com o efluente bruto já com o pH corrigido entre 7,0 a 7,2 (com solução de hidróxido de sódio) e em temperatura ambiente.

A vazão de entrada do biorreator foi inicialmente regulada para 1,0 mL/min, o que forneceu 120 h de tempo de retenção hidráulico (TRH), em seguida aumentou-se a vazão para 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL/min, fornecendo 96, 72, 48 e 24 h de TRH respectivamente, conforme descrito na Tabela 1. Para tanto, mediu-se diariamente a DQO, DBO e O&G do efluente clarificado.

Um teste controle também foi realizado da mesma forma que os experimentos acima descritos, porém para este teste utilizou-se apenas bagaço de cana e farelo de girassol esterilizado para preencher o biorreator, ou seja, sem o inóculo de *R. microsporus*. Os valores de TRH adotados no teste controle foram 120 h e 24 h, também conforme Tabela 1. Sendo assim, os experimentos com o sólido fermentado foram seguidos ininterruptamente por 101 dias, e o teste controle seguiu por 37 dias interruptos.

Medição da eficiência do tratamento enzimático

Através das análises diárias da DQO, DBO e O&G do efluente clarificado realizou-se a medição da eficiência do biorreator no tratamento enzimático do efluente de frigorífico, medida como percentagem de remoção de DQO, DBO e O&G, conforme equação 1. Estas medições foram determinadas para cada TRH no biorreator, de 24 a 120 h equivalentes a vazões de 5,0 mL/min a 1,0 mL/min.

$$\text{Eficiência} = [(C_0 - C)/C_0] \cdot 100$$

equação 1

Sendo:

C_0 : Concentração de DQO, DBO ou O&G no efluente bruto (mg/L);

C: Concentração de DQO, DBO ou O&G no efluente clarificado (mg/L).

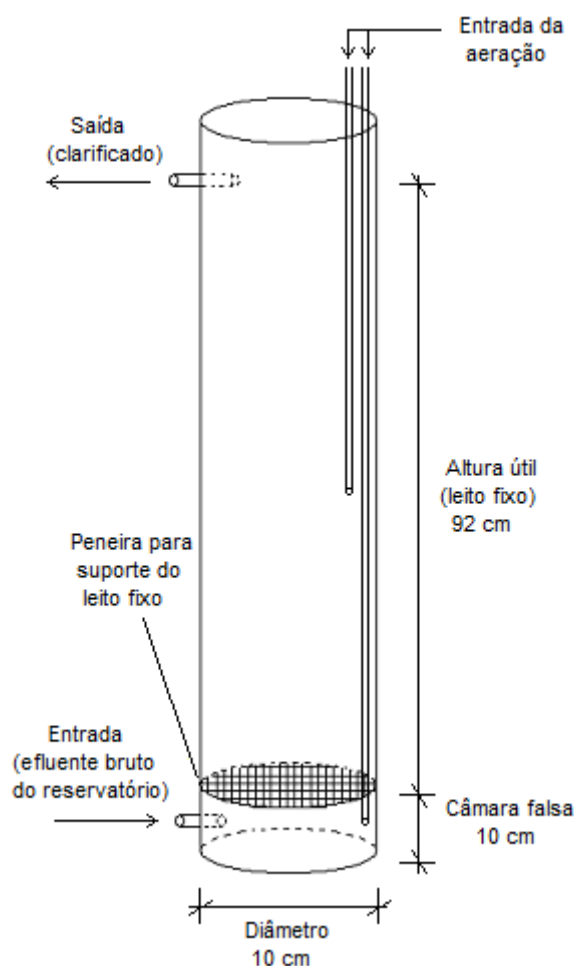


Figura 1: Biorreator de leito fixo utilizado para tratamento enzimático do efluente frigorífico. Esquema sem escala.

Verificação da viabilidade de *R. microsporus* ao final dos experimentos

Visando verificar se ao final dos experimentos ainda havia presença significativa de *R. microsporus*, coletou-se uma alíquota de aproximadamente 5 g do sólido do topo do biorreator (5 a 10 cm de profundidade em relação a saída do biorreator). Esta alíquota foi então inoculada em duas placas de Petri distintas, uma delas contendo apenas ágar PDA 39 g/L e outra contendo ágar PDA 39 g/L e cloranfenicol 100 mg/L (antibiótico utilizado para inibir o crescimento de bactérias). Estas placas foram então incubadas a 30 °C por 5 dias. Foi realizada também a microscopia óptica de ambas as placas após a incubação. Procedeu-se da mesma forma para o sólido do leito fixo no teste controle.

Tabela 1: Variação da vazão de entrada no biorreator de leito fixo conforme tempo de retenção hidráulico.

EXPERIMENTO	VAZÃO DE ENTRADA (mL/min)	TEMPO DE RETENÇÃO HIDRÁULICO (h)	TEMPO DE EXPERIMENTO
Com sólido fermentado	1,0	120	16 dias de período de adaptação e 20 dias de experimentos
	2,0	96	2 dias para estabilização e 14 dias de experimentos
	3,0	72	2 dias para estabilização e 15 dias de experimentos
	4,0	48	2 dias para estabilização e 14 dias de experimentos
	5,0	24	2 dias para estabilização e 14 dias de experimentos
Teste controle	1,0	120	7 dias de período de adaptação e 14 dias de experimentos
	5,0	24	2 dias para estabilização e 14 dias de experimentos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade do sólido fermentado produzido e caracterização do efluente bruto

O sólido fermentado por *R. microsporus* (mistura 3:1 bagaço de cana e farelo de girassol) apresentou atividade lipolítica de 70 ± 7 U/g SS. Porém, como após o término do cultivo este foi armazenado a -18°C (por 15 dias), em seguida descongelado, sua atividade de lipase caiu para 33 ± 2 U/g SS o que representa 47% de perda de atividade. A diminuição na atividade enzimática após ciclos de congelamento e descongelamento é um fenômeno comum e deve-se a alterações irreversíveis ocorridas nas ligações de hidrogênio das enzimas, ocasionando sua desnaturação (Cohen *et al.*, 2010 e Hu & Tycko, 2010). Apesar desta perda, a atividade enzimática residual ainda foi considerada alta, sendo assim decidiu-se manter o procedimento de congelamento do sólido após o cultivo, visto que outras alternativas envolveriam a secagem do sólido em estufa ou liofilização, procedimentos que têm um custo mais elevado frente ao congelamento do material, mas, acarretam perdas de atividade menores, de aproximadamente 15%, (ALBERTON *et al.*, 2010).

O efluente de frigorífico coletado apresentou elevado potencial poluidor, dados os altos valores de pH 6,6; DQO 2944 ± 433 mg/L; DBO 554 ± 70 mg/L e O&G 603 ± 23 mg/L, mostrando-se também pouco biodegradável, já que a razão DBO/DQO foi de 0,19.

Eficiência do tratamento enzimático do efluente frigorífico

Inicialmente, assim que o biorreator começou a ser alimentado com o efluente bruto, notou-se um período de adaptação da biomassa no biorreator. Este período foi estabelecido como o tempo necessário para estabilização da DQO do efluente clarificado (queda de uma DQO inicial alta até um valor mínimo constante). Para os experimentos com o sólido fermentado, este período foi de 16 dias, já para o teste controle este período foi de 7 dias (Tabela 1). A diferença nos tempos de adaptação devem-se a presença do inóculo de *R. microsporus*, já que fungos apresentam crescimento mais lento frente as bactérias, sendo assim, no teste controle o crescimento e adaptação dos microrganismos foi mais rápido, já que mostrou-se prioritariamente bacteriano (resultado que será discutido em seguida).

Para a avaliação da eficiência do tratamento enzimático levou-se em consideração as seguintes características:

- A atividade de lipase do sólido fermentado (leito fixo do biorreator) diminuiu sensivelmente nos 9 primeiros dias, estabilizando-se em seguida em $5,6 \pm 2,5$ U/g SS até o 101º dia de experimento;
- A atividade de lipase do leito fixo no teste controle (mistura 3:1 bagaço de cana:farelo de girassol sem inóculo de *R. microsporus*) manteve-se abaixo do limite de quantificação do método titulométrico (menor que 0,1 U/g SS) ao longo dos 37 dias de experimentos;

- Os experimentos realizados com o sólido fermentado nos dias 20, 21, 22, 27, 30, 31 e 61 foram desconsiderados para análise da eficiência do tratamento enzimático, já que nestes dias ocorreram interrupções de aproximadamente 8 h na alimentação do biorreator devido ao entupimento da mangueira da bomba peristáltica;
- Os dois dias necessários à estabilização da DQO e DBO na transição de cada tempo de retenção não foram considerados, pois um novo equilíbrio no metabolismo dos microrganismos estava sendo estabelecido em resposta a um aumento na carga orgânica de entrada no biorreator;
- Ou seja, para a avaliação da eficiência, considerou-se um período de 14 dias para cada TRH.

Sendo assim, a Tabela 2 mostra a eficiência atingida na remoção da DQO, DBO e O&G no tratamento enzimático do efluente de frigorífico para cada tempo de retenção no biorreator.

Tabela 2: Variação da eficiência do biorreator no tratamento do efluente de frigorífico tanto nos experimentos com o sólido fermentado por *Rhizopus microsporus* como no teste controle para cada tempo de retenção hidráulico. Características do efluente bruto: DQO $2978 \pm 385 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$, DBO $554 \pm 69 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$, DBO/DQO 0,19 e O&G $603 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$.

PARÂMETRO		CONTROLE 120 h	120 h	96 h	72 h	48 h	24 h	CONTROLE 24 h
DQO	Média (mg/L)	209 ± 51	225 ± 20	288 ± 32	378 ± 28	461 ± 38	515 ± 17	520 ± 52
	Eficiência (%)	93,0	91,5	90,3	87,3	84,5	82,7	82,6
DBO	Média (mg/L)	68 ± 39	25 ± 5	44 ± 10	183 ± 26	237 ± 27	283 ± 17	187 ± 26
	Eficiência (%)	87,8	95,6	92,1	67,0	57,3	49,0	66,3
DBO/DQO	Média	$0,31 \pm 0,13$	$0,11 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,03$
O&G	Média (mg/L)	106 ± 66	21 ± 25	49 ± 20	19 ± 20	28 ± 19	22 ± 12	120 ± 14
	Eficiência (%)	79,0	95,9	90,3	96,2	94,5	95,7	76,2

Nota-se na Tabela 2 o aumento contínuo nas concentrações médias de DQO e DBO conforme diminuição do tempo de retenção, com consequente diminuição na eficiência do tratamento. Isto ocorre, pois, menores cargas orgânicas (obtidas em valores altos de TRH) facilitam o metabolismo microbiológico, aumentando por consequência a utilização do substrato. Além disso, com alta retenção hidráulica, o fenômeno de filtração no sólido do leito fixo também é muito significativo. Observam-se também reduções bastante significativas na DQO (cerca de 92%), principalmente com o maior tempo de retenção hidráulico (120 h).

O tratamento enzimático, quando comparado com o teste controle, apresentou remoções similares de DQO, porém mostrou um aumento na biodegradabilidade (razão DBO/DQO) do efluente para um TRH de 72, 48 e 24 h, conforme detalhado na Figura 2. Nestes experimentos, o efluente clarificado apresentou uma variação nos valores de DBO/DQO entre 0,40 a 0,59.

O aumento na biodegradabilidade do efluente nos experimentos com 72, 48 e 24 h de TRH (com o sólido fermentado) deve-se provavelmente a hidrólise dos O&G do efluente bruto pelas lipases presentes no leito fixo do biorreator, já que a conversão de lipídeos em moléculas mais simples facilita a absorção destes compostos pelos microrganismos, característica comprovada pela menor biodegradabilidade obtida no efluente clarificado no teste controle com 24 h de TRH comparada ao experimento com o sólido fermentado (DBO/DQO média de 0,36 frente a 0,55).

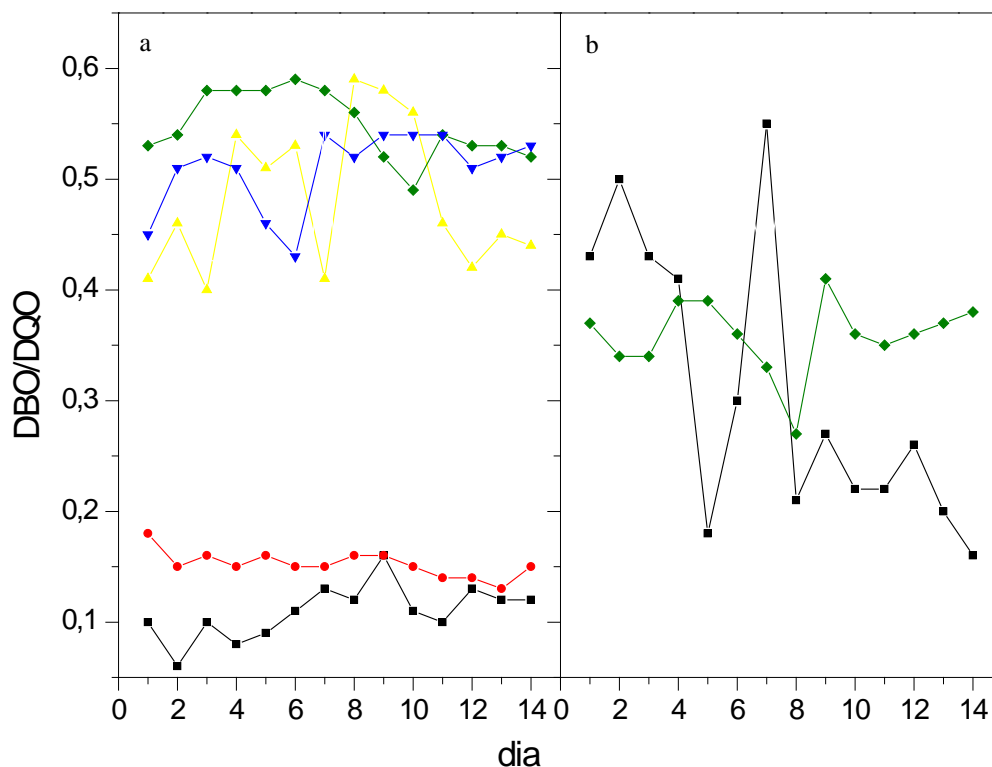


Figura 2. Razão DBO/DQO no efluente clarificado. a) Experimentos com o sólido fermentado e com tempo de retenção hidráulico (TRH) de 120 h (—■—), 96 h (—●—), 72 h (—▲—), 48 h (—▼—) e 24 h (—◆—). b) Teste controle com tempo de retenção hidráulico (TRH) de 120 h (—■—) e 24 h (—◆—). Razão DBO/DQO no efluente bruto 0,19.

A remoção de O&G nos experimentos com o sólido fermentado foram maiores quando comparadas ao teste controle, conforme Figura 3, dada uma média de O&G no clarificado de 28 ± 12 mg/L (referente aos valores de TRH de 120, 96, 72, 48 e 24 h) frente à uma média de 113 ± 10 mg/L no teste controle (referente aos valores de TRH de 120 e 24 h). Isto mostra que a presença do inóculo de *R. microsporus* e por consequência suas lipases, aumentam sensivelmente a eficiência na remoção de O&G, dada a maior hidrólise de lipídeos ocasionadas pelas referidas lipases (fato não verificado no teste controle).

Isto explica também a diferença na DBO quando se compara o experimento com o sólido fermentado com 24 h de TRH com o teste controle com 24 de TRH. Neste comparativo a DBO média do clarificado foi cerca de 34% menor no teste controle (média de 187 frente a 283 mg/L). Isto foi provavelmente devido à maior concentração de O&G no clarificado do teste controle (média de 120 frente a 22 mg/L), de forma que, devido a seu efeito recalcitrante, acabou por diminuir a fração biodegradável da matéria orgânica, reduzindo o valor da razão DBO/DQO.

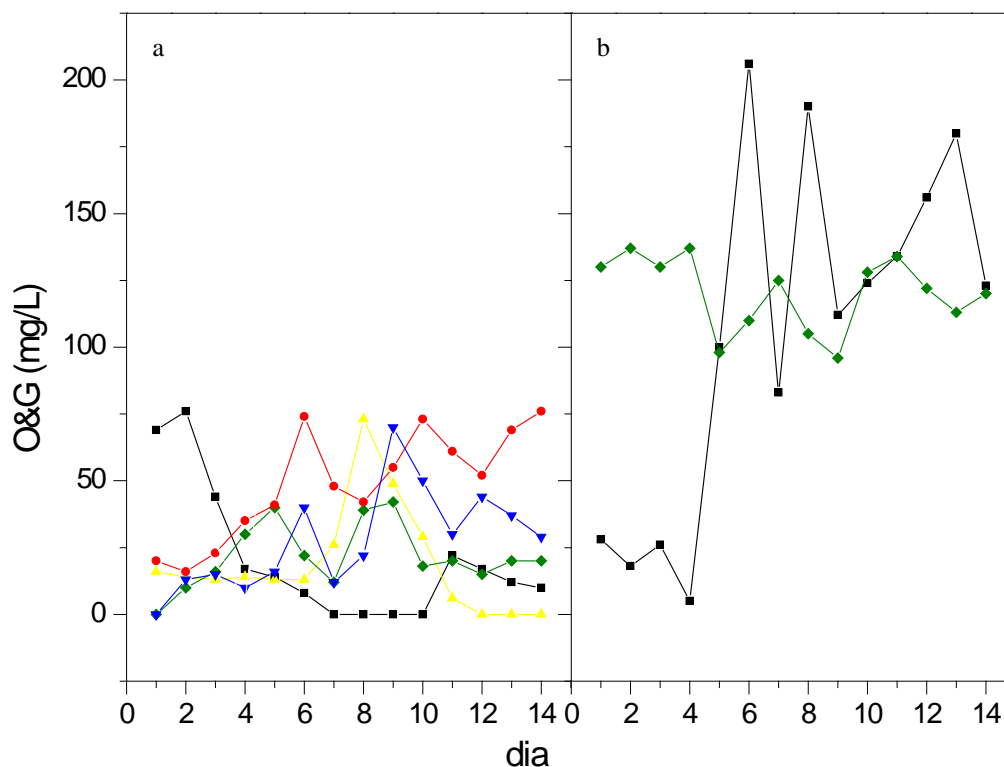


Figura 3. Óleos e graxas (O&G) no efluente clarificado. a) Experimentos com o sólido fermentado e com tempo de retenção hidráulico (TRH) de 120 h (—■—), 96 h (—●—), 72 h (—▲—), 48 h (—▼—) e 24 h (—◆—). b) Teste controle com tempo de retenção hidráulico (TRH) de 120 h (—■—) e 24 h (—◆—). Média de O&G no efluente bruto 603 ± 23 mg/L.

Presença de *R. microsporus* no leito fixo ao final dos experimentos

A Figura 4 mostra as placas de Petri onde foi inoculado o sólido fermentado do leito fixo do biorreator. Nota-se o crescimento de micélios aéreos (atingindo a tampa da placa de Petri), de textura de algodão e esporos escuros de coloração marrom-acinzentada, características típicas de *R. microsporus* (GEFOR, 2010). Pode-se observar também que visualmente não houve diferença significativa no crescimento de *R. microsporus* na presença ou na ausência de cloranfenicol, mostrando que, mesmo competindo com as bactérias existentes no efluente bruto, o fungo foi capaz de desenvolver-se no sólido do biorreator. Observa-se também que *R. microsporus* inibiu o crescimento das bactérias no ágar PDA, já que não foi notada a formação típica de halos de colônias bacterianas na placa onde não foi adicionado o cloranfenicol (Figura 4).

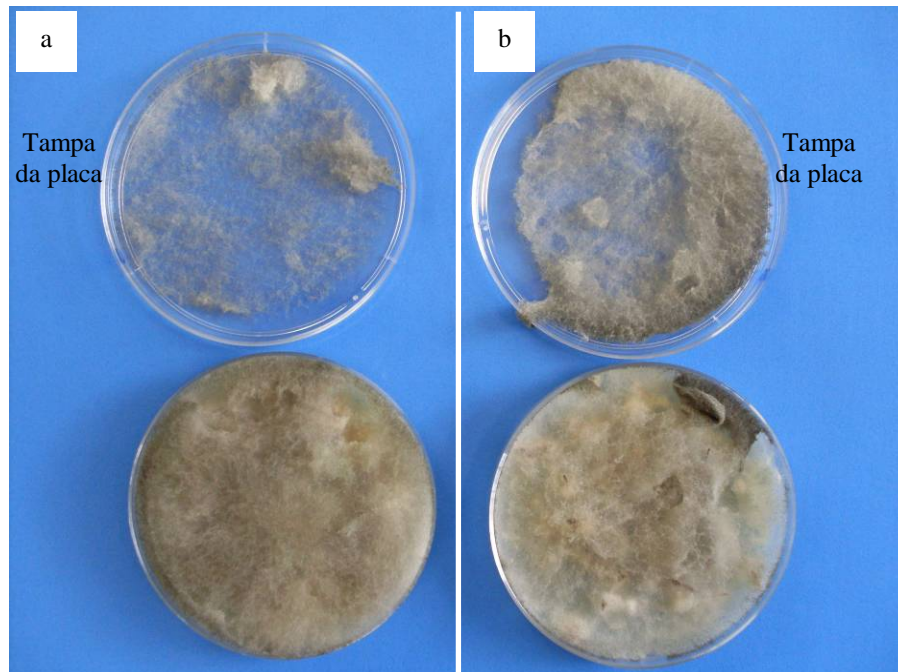


Figura 4. Crescimento de *Rhizopus microsporus* após incubação por 5 dias a 30 °C de alíquota do sólido retirado do biorreator após 96 dias de tratamento do efluente. Placas de Petri abertas. a) Inoculação em ágar PDA com cloranfenicol. b) Inoculação em ágar PDA sem cloranfenicol.

Visando à confirmação destes resultados, foi realizada uma microscopia óptica em ambas as placas de Petri, conforme mostra a Figura 5. Observa-se a formação de esporângios pequenos, de haste curta e com columelas semi-esféricas. Estas características, segundo Polizeli *et al.* (2006) *apud* Schipper *et al.* (1985), são típicas de *R. microsporus*. Também não foi notada diferença visualmente significativa na microscopia realizada nos fungos que cresceram na presença ou na ausência de cloranfenicol, mostrando que em ambos os casos trata-se do mesmo microrganismo.

Sendo assim, pode-se afirmar que a hidrólise dos lipídeos existentes no efluente bruto foi ocasionada, na maior parte, devido à atuação das lipases produzidas por *R. microsporus*, já que este fungo é capaz de competir com as bactérias deste efluente e realizar seu metabolismo.

No 36° dia do teste controle (com duração total de 37 dias), também foi coletada uma alíquota do sólido do biorreator, que foi inoculada em ágar PDA, tanto na presença como na ausência de antibiótico cloranfenicol, por 5 dias a 30 °C, conforme mostra a Figura 6. Observa-se a formação de pequenos halos bacterianos e crescimento de hifas em ambas as placas, provindos da microflora endógena do efluente bruto. Comparando este resultado com as baixas eficiências na remoção de O&G obtidas no teste controle, admite-se que os microrganismos endógenos do efluente, embora capazes de se desenvolver no biorreator, não possuem a mesma capacidade de degradação de O&G que *R. microsporus* apresentou.

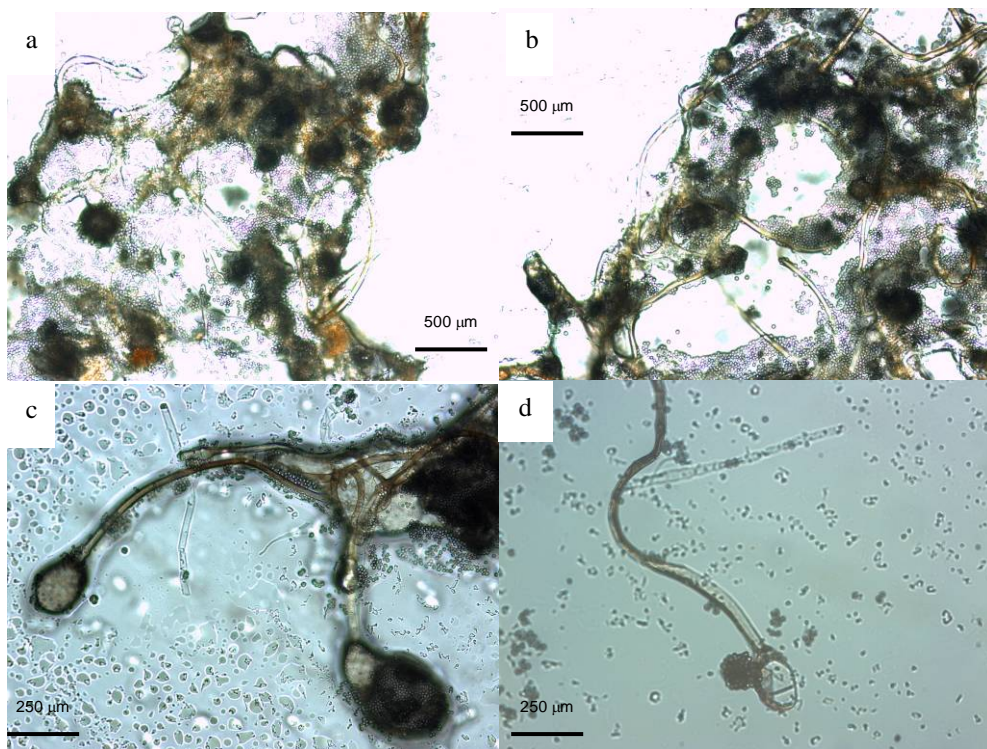


Figura 5. Microscopia óptica de *Rhizopus microsporus*. a) Crescimento na presença de cloranfenicol, b) Crescimento na ausência de cloranfenicol, c) Detalhe dos esporângios eclodido (esquerda) e com esporos (direita), d) Esporângio liberando esporos.

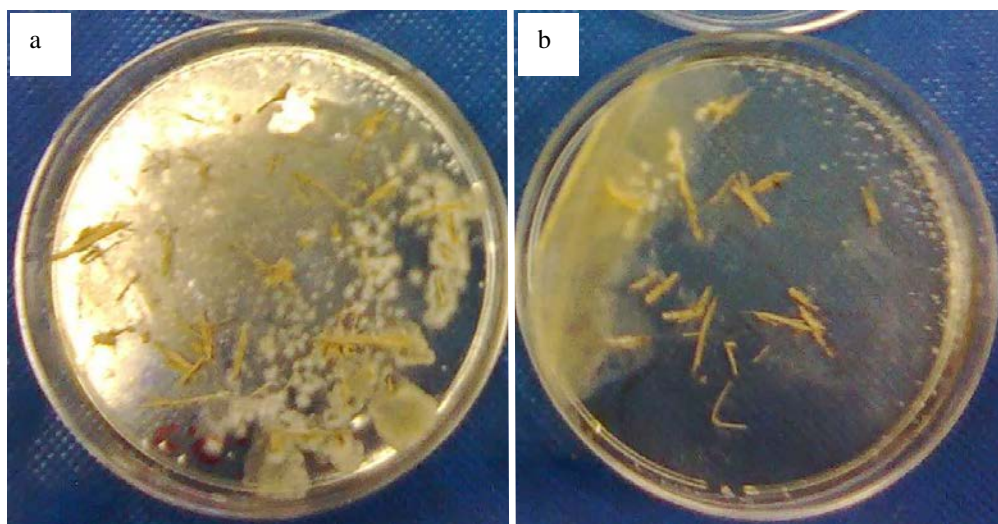


Figura 6. Crescimento de microrganismos endógenos do efluente bruto após incubação de 5 dias a 30 °C de alíquota do sólido retirado do biorreator. a) Inoculação em ágar PDA com cloranfenicol. b) Inoculação em ágar PDA sem cloranfenicol.

Potencial de aplicação deste estudo

Visando estabelecer o potencial de aplicação industrial do presente trabalho, realizou-se um comparativo com os trabalhos mais recentes que envolveram sistemas análogos de tratamento enzimático de efluentes, tais como Cirne *et al.*, 2007; Jeganathan *et al.*, 2007; Valladão *et al.*, 2007; Damasceno *et al.*, 2008; Rigo *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2009 e Alberton *et al.*, 2010. Três fatores impedem a comparação direta entre os resultados deste

trabalho com os citados. Inicialmente, o tipo de tratamento adotado é diferente dos demais, pois utiliza um biorreator empacotado com o sólido fermentado, e não a adição de pequenas proporções de sólido fermentado diretamente ao efluente bruto. Desta forma, não é possível estabelecer qual a proporção em m/v de sólido fermentado/efluente adotado, dado que se utilizou um sistema de fluxo contínuo. A forma como foi analisada a eficiência do tratamento também impede comparações diretas, já que os estudos citados adotaram apenas o monitoramento da formação de ácidos livres após a pré-hidrólise, medindo a DQO e/ou DBO do efluente tratado somente após a aplicação de uma etapa clássica de tratamento (exceto o estudo de Alberton *et al.* 2010). Por fim, estes estudos utilizaram efluentes diferentes do adotado no presente trabalho, impossibilitando uma comparação direta entre a eficiência do tratamento obtido.

Visando à aplicação deste processo na indústria, a elevada eficiência de tratamento (alta remoção de matéria orgânica) mostra-se interessante, pois com altas reduções de DQO, DBO e O&G apenas com o tratamento enzimático, a etapa subsequente de pós tratamento deste efluente ficará mais simples e compacta, já que a carga orgânica aplicada sobre ela será menor. Além disso, segundo Von Sperling (2005) e Metcalf & Eddy (2003), sistemas com estas características apresentam menores custos de implantação, operação, gasto de energia e menor geração de lodo. Desta forma, são sugeridas duas formas possíveis de utilização do biorreator:

- Como etapa principal de tratamento do efluente: neste caso, o biorreator deve operar com 120 a 96 h de retenção hidráulica, já que nestes casos a remoção na DQO, DBO e O&G permaneceu acima de 90%, praticamente atingindo os limites de emissão de efluentes no estado do Paraná (resolução CEMA 070/09) exceto pelo limite de 200 mg/L de DQO. Desta forma, uma etapa subsequente de baixo custo e pouca geração de lodo, tais como uma lagoa de maturação, zona de raízes ou coagulação de polimento pode ser capaz de atingir o limite de DQO estabelecido pela mesma legislação ;
- Como etapa de pré tratamento do efluente: neste caso, o biorreator deve operar com 24 h de retenção hidráulica, já que o objetivo não mais é remover com alta eficiência a matéria orgânica, e sim hidrolisar O&G para tornar o efluente mais biodegradável. Desta forma, uma etapa subsequente clássica, como lodos ativados, seria capaz de realizar o tratamento final do efluente agora mais biodegradável. Na verdade, a investigação de um TRH menor que 24 h faz-se interessante, pois potencialmente pode ser capaz de remover O&G com alta eficiência.

É importante ressaltar que o presente estudo apresenta inovações ainda não reportadas na literatura, como o uso de um biorreator aeróbico de fluxo contínuo e empacotado com um sólido fermentado. A forma como este biorreator foi utilizado apresentou características de sistemas de tratamento com crescimento fixo, tal qual um biofiltro, já que é capaz de realizar o tratamento do efluente através do próprio metabolismo da biomassa aderida em seu leito, visto que:

- A grande quantidade de inóculo de fungo presente na massa de sólido empacotada no biorreator facilita a adaptação e a competição com as bactérias endógenas do efluente;
- A especificidade do fungo em produzir uma alta atividade lipolítica fornece uma vantagem competitiva sobre as bactérias endógenas do efluente, também facilitando sua adaptação;
- O empacotamento do biorreator com o sólido fermentado, por consequência a presença da lipase e do micélio do fungo no sólido, assistido pela injeção de ar (biorreator aeróbico) permite que o fungo cresça e se desenvolva no biorreator, não havendo a necessidade de reposição ou troca do biocatalisador contido no leito fixo. Isto é possibilitado pela presença de oxigênio dissolvido, bem como das fontes de carbono e de nutrientes providas do efluente bruto, que fornecem as necessidades básicas ao metabolismo do fungo;

Isto se mostra bastante inovador, já que os trabalhos descritos na literatura não apresentam estas características, pois consistem em adicionar continuamente porções de sólido fermentado no efluente, objetivando apenas a hidrólise de O&G pelas lipases, sem preocupar-se com o desenvolvimento do microrganismo responsável pela produção da lipase no sistema de pré-hidrólise. A exceção está no estudo de Alberton *et al.* 2010, que observaram o crescimento de *R. microsporus* no efluente durante as bateladas de experimentos.

Sendo assim, o processo aqui estudado potencialmente aproxima-se mais da realidade industrial, pois propõe um tratamento biológico de fluxo contínuo, possibilitando o crescimento do microrganismo responsável pela produção da lipase no sistema de tratamento, além de utilizar um sólido fermentado de baixo custo de produção.

Embora ao logo dos 101 dias de experimentos com o sólido fermentado não tenha sido observado arraste de flocos de biomassa com o efluente clarificado (aglomerados de sólidos e microrganismos), este fenômeno é comum aos sistemas de tratamento biológico de crescimento fixo, tais como biofiltros, filtros biológico rotativos ou lodos ativados com biodisco, e é devido a saturação do leito que inexoravelmente ocorre ao longo do tempo de operação (Metcalf & Eddy, 2003). Além disso, embora também não tenha sido analisada neste estudo, a morte de microrganismos também é inerente a esta forma de tratamento, devido ao ciclo de vida limitado dos microrganismos (Von Sperling, 2005). No entanto, assim como é realizado em sistemas de biofiltração e filtros biológico rotativos, os flocos de biomassa arrastados com o clarificado podem ser facilmente sedimentados pela aplicação da decantação secundária, que permite também a recirculação da biomassa arrastada para o biorreator, bem como o seu descarte, caso o teor de SSF no sólido de fundo do decantador acuse alta idade do lodo (GRADY *et al.*, 1999).

CONCLUSÃO

O tratamento de pré-hidrólise de efluente frigorífico em fluxo contínuo demonstrou-se capaz de realizar o abatimento de O&G (20% maior que a redução observada no teste controle), ocasionando o aumento na biodegradabilidade do efluente. Menores tempos de retenção hidráulica demonstraram-se mais adequados para aumentar a biodegradabilidade, o que possibilita maior viabilidade para o escalonamento do processo. O aumento da biodegradabilidade do efluente pode facilitar a operação de unidades biológicas subsequentes que porventura possam existir numa indústria, evitando problemas como entupimento por placas de gordura, baixa eficiência global de tratamento e formação de lodo filamentoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTON, D.; MITCHELL, D.A.; CORDOVA, J.; ZAMORA, P.P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. *Food Technol.* v.48, p.28-35, 2010.
2. 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.
3. CASTILHO, L.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v.4, p.239-247, 2000.
4. CEMA 070 – CONSELHO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução nº 070 de 01 de outubro de 2009. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Paraná.
5. CIRNE, D.G.; PALOUMETA, X.; BJÖRNSSONA, L.; ALVESB, M.M.; MATTIASSONA, B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste - Effects of lipid concentration. *Renewable Energy*, 32, 965-975, 2007.
6. COHEN, I.P.G.; CASTELLO, P.R.; FLECHA, F.L.G. Ice-induced partial unfolding and aggregation of an integral membrane protein. *Biochimica et Biophysica Acta.* v.1798, p.2040-2047, 2010.
7. DAMASCENO, F.R.C.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Impact of the addition of an enzyme pool on an activated sludge system treating dairy wastewater under fat shock loads. *Chem Technol Biotechnol*, v.83, p.730-738, 2008.
8. DONKIN, M.J. Bulking in aerobic biological systems treating dairy processing wastewaters. *International Journal of Dairy Technology* v.50, p.67-72, 1997.
9. GRADY Jr., C. P. L.; DAIGGER, G. T.; LIM, H. C. Biological Wastewater Treatment. 2ª Ed., Marcel Dekker Inc., 1999.
10. HU, K.N.; TYCKO, R. What can solid state NMR contribute to our understanding of protein folding? *Biophysical Chemistry.* v.151, p10-21, 2010.
11. JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. *Journal of Hazardous Materials.* v.145, p.127-135, 2007.
12. LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.66, p.43-54, 2010.
13. METCALF & EDDY. Wastewater Engineering: treatment and reuse. Metcalf & Eddy Inc. 4ª ed. 2003.
14. PEREIRA, E. B; CASTRO, H.F DE; FURIGO JÚNIOR, A. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola utilizando lipase de *Candida rugosa*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, Florianópolis. UFSC, 2003. 1CD-ROM.

15. RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M. Application of Different Lipases as Pretreatment in Anaerobic Treatment of Wastewater. *Environmental Engineering Science*. v.25, n.9, 2008.
16. ROSA, D.R.; DUARTE, I.C.S.; SAAVEDRA, N.K.; VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M.C.; 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.
17. SUN, S.Y.; XU, Y.. Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, 43, 219–224, 2008.
18. VALLADÃO, A. B. G.; BIAGGIO, J. A.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Avaliação da toxicidade de preparado enzimático sólido utilizado no tratamento anaeróbio de efluentes de abatedouro de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIASANITÁRIA E AMBIENTAL, 24, Belo Horizonte, 3-7 set. ABES, 2007. 1CD ROM.
19. VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDÉZ, R.; LEMA, J.M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*. v. 74, n. 3, p. 231-239, 2000.
20. VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. v.1, 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2005.