

## Influência da Variação de Carga Orgânica na Formação de Biofilme no Tratamento de Efluente de Laticínios

### Influence of Organic Load Variation on Biofilm Formation in Dairy Effluent Treatment

#### RESUMO

A produção de leite e seus derivados conduz à geração de efluentes com cargas orgânicas diferentes que pode interferir na formação do biofilme em sistema de tratamento com biomassa aderida. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da variação de carga orgânica volumétrica (COV) na formação do biofilme por meio da análise da concentração de proteínas (PT), polissacáridos (PS), Bactérias Oxidadoras de Amônia (BOA), Bactérias Oxidadoras de Nitrito (BON), desnitrificantes e heterotróficas em um reator de leite estruturado. Foram coletadas amostras do material suporte presente no reator em cada fase de operação, Fase I com COV de  $1,2 \text{ KgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  e fase II com  $1,4 \text{ KgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . As amostras foram submetidas as técnica de extração das substâncias poliméricas extracelulares; técnica de NMP para as bactérias nitrificantes e desnitrificantes e contagem padrão em placas para estimar a concentração das bactérias heterotróficas. Constatou-se que independentemente da elevação do COV, a formação do biofilme propiciou aumento das concentrações de PS e PT em ambas as fases e manteve o número total de microrganismos. Conclui-se que o aumento da COV não inibiu a formação do biofilme e não foi prejudicial para a atividade das bactérias responsáveis pela formação do biofilme.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biopolímeros. Tratamento Biológico. Indústria de Laticínios.

#### ABSTRACT

The milk's production and its derivatives lead to the generation of effluents with different organic loading that may interfere with the formation of biofilm in a treatment system with adherent biomass. Therefore, the objective of this work was to analyze the influence of organic loading rate - OLR on biofilm formation by analyzing protein concentration (PT), polysaccharides (PS), Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB), Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB), denitrifying and heterotrophic in a structured bed reactor. Samples of the support material present in the reactor were collected in each phase of operation, Phase I with OLR of  $1.2 \text{ KgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  and phase II with  $1.4 \text{ KgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . The samples were submitted to the extracellular polymeric substances' extraction technique; NMP technique for nitrifying and denitrifying bacteria and standard plate counting to estimate the concentration of heterotrophic bacteria. Regardless of the OLR increase, biofilm formation led to increased PS and PT concentrations in both phases and maintained the total number of

**Alex da Cunha Molina**  
[alexdacunhamolina@gmail.com](mailto:alexdacunhamolina@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Prof<sup>(a)</sup> Dr<sup>(a)</sup> Kátia Valéria Marques Cardoso Prates**  
[kvprates@gmail.com](mailto:kvprates@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Ms. Camila Zoe Correa**  
[Camila.z.correa@gmail.com](mailto:Camila.z.correa@gmail.com)  
Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

**Prof<sup>(a)</sup> Dr<sup>(a)</sup> Deize Dias Lopes**  
[deizeuel@gmail.com](mailto:deizeuel@gmail.com)  
Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

**Edgar Augusto Aliberti**  
[edgaraliberti@alunos.utfrpr.edu.br](mailto:edgaraliberti@alunos.utfrpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Janaina Casado Rodrigues da Silva**  
[Janainnacasado@hotmail.com](mailto:Janainnacasado@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



microorganisms. It was concluded that the increase in OLR did not inhibit biofilm formation and was not prejudicial to the activity of bacteria responsible for biofilm formation.

**KEYWORDS:** Biopolymers. Biological treatment. Dairy Industry.

## INTRODUÇÃO

O Brasil vem se destacando cada vez mais na produção de leite, ganhando notoriedade mundial. No ano de 2017 o país se tornou o quarto maior produtor no mundo, produzindo cerca de 35,1 bilhões de litros de leite (Embrapa 2018). Assim como quase todos os processos industriais, a indústria de laticínio, gera resíduos, principalmente efluentes com Cargas Orgânicas Volumétricas (COV) ricas em nutrientes e matéria orgânica.

Efluentes lançados em corpos hídricos com altas concentrações de nutrientes e matéria orgânica podem gerar diversos danos ao meio ambiente, principalmente ao meio aquático como processo de eutrofização dos corpos d'água, alteração da diversidade de espécies, mudança na qualidade das águas, alteração do pH, geração de toxinas, entre outros, devido ao aumento de matéria orgânica e nutrientes (EPA, 1993; CALIJURI et al., 2006).

Assim, é necessário que ocorra um tratamento prévio do efluente, para diminuir a COV antes do lançamento no corpo hídrico receptor. Dentre os tratamentos mais utilizados, destacam-se os tratamentos biológicos, entre eles, os que utilizam reatores de leito estruturado.

Nestes reatores há formação de biofilme. O biofilme é um agregado organizado de microrganismos que vivem dentro de uma matriz polimérica extracelular constituída principalmente de polissacáridos (PS), proteínas (PT), ácido húmico, ácido nucléico e fosfolipídios, que esses microrganismos produzem e se fixam. No caso de reatores de leito estruturado, o material suporte (MS) para a formação do biofilme seria a espuma de poliuretano (HURLOW et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da variação de COV na formação de biofilme no MS presente em um reator de leito estruturado e fluxo contínuo, por meio da concentração de PS e PT e concentração de bactérias nitrificantes, desnitrificantes e heterotrófica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo utilizou-se um reator de leito estruturado de fluxo contínuo operado com efluente de laticínios. A coleta do efluente foi realizada no início de cada fase experimental, após o tratamento por flotor. O efluente coletado foi armazenado em geladeira para manutenção de suas características até o momento de ser utilizado.

O reator foi construído em material acrílico, com um volume total de 2,36 litros (volume útil de 1,76 litros, volume da espuma de 0,45 litros e volume do lodo de 0,15 litros). Como MS empregou-se espumas de poliuretano com um diâmetro aproximado de 1,5 cm e 48 cm de altura, cortadas de forma cilíndrica, totalizando

4 estruturas internas no reator. A fixação das estruturas cilíndricas foi feita com hastes de ferro presas as extremidades do sistema.

O reator foi alimentado por meio de uma bomba (ProMinent modelo GALA), para aeração foi utilizada um compressor de ar da marca Panther II. A vazão de recirculação utilizada foi de três vezes a vazão de entrada ( $Q_r = 3 \cdot Q_e$ ).

O sistema foi operado com TDH de 16 horas e houve o controle da temperatura por meio de um sistema de recirculação de água e manta que envolvia o reator, para manter a temperatura próxima aos 28°C, desta forma os microrganismos ficariam em sua faixa ótima de crescimento.

Foram trabalhadas 2 fases experimentais, com variação das cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas no sistema de tratamento. Fase 1 com COV de 1,2 ( $\text{KgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) e a Fase 2 com COV de 1,4 ( $\text{KgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Ciclo de Aeração Intermitente de 2 horas de aeração intercalando 1 hora sem aeração. O ciclo de aeração intermitente e o TDH utilizados foram definidos com base nos trabalhos de Moura et al. (2012) e Correa et al. (2015).

A quantificação da biomassa aderida ao MS foi estimada pelo método do Número Mais Provável (NMP) seguindo o descrito por Mendonça (2002) na metodologia de Schmidt e Belser (1984). Os organismos estudados foram bactérias nitrificantes (Bactérias Oxidadoras de Amônia – BOA e Bactérias Oxidadoras e Nitrito (BON) e desnitrificantes. Para a quantificação de bactérias heterotróficas aplicou-se a metodologia da contagem padrão em placas.

Foi coletado de dentro do reator uma amostra de uma das quatro espumas de poliuretano, com aproximadamente 3 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura, sendo cortados com uma tesoura estéril de partes aleatórias da espuma. Sendo assim, a amostra foi cortada em 4 partes, sendo utilizado duas: a primeira utilizada para a quantificação das bactérias e a segunda para a determinação de PS e PT.

As amostras do MS foram preparadas segundo os procedimentos descritos no trabalho de Correa et al. (2015).

Todas as amostras coletados passaram por um processo de diluição em série em solução salina, para então seguir as metodologias propostas para determinação de  $\text{NMP} \cdot 100 \cdot \text{mL}^{-1}$ . Para cada material foi feito a diluição em série até  $10^{-7}$ .

Para determinar a concentração de polissacarídeos e proteínas, inicialmente realizou-se a extração das substâncias poliméricas extracelulares total que foi determinada após a lise completa das células aderidas ao MS a partir de metodologia adaptada de Cammarota (1998).

O MS foi inserido em um tubo Falcon de 50 mL e adicionado ao tubo 10 mL de solução de NaOH 1 mol/L. Em seguida, o recipiente foi colocado em banho-maria à 100°C, durante 15 minutos. Ao finalizar este período, o MS foi retirado e o tubo centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm e posteriormente filtrado em membrana éster celulose (diâmetro médio de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ). O filtrado foi submetido à determinação de PS e PT em espectrofotômetro (HACH).

Depois de realizadas as extrações, para determinação da concentração de PS foi utilizado o método colorimétrico de Dubois (1956). Esse método consiste na reação da amostra com fenol após ser aquecido com a adição de ácido sulfúrico. Ao término da reação, a amostra foi resfriada com gelo e lida a 490 nm em

espectrofotômetro. Para a construção da curva de calibração foi utilizada a glicose como padrão.

Para determinar a concentração das PT foi utilizado o método de Bradford (1976), que é baseado na reação das proteínas com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, após a reação foi feita a leitura de absorbância em 595 nm, em espectrofotômetro. Para a elaboração da curva de calibração foi utilizada a albumina de soro bovina como padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

É possível observar os resultados de NMP das BOA, BON e desnitrificantes em cada uma das condições operacionais na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias do NMP.100mL<sup>-1</sup> das BOA, BON e DESNITRIFICANTE quantificadas no material suporte nas duas fases operadas (Fase I e II)

FASE	DATA	NMP.100mL <sup>-1</sup>		
		BOA	BON	DESNITRIFICANTE
I	14/12/2018	1,60.10 <sup>11</sup>	1,60.10 <sup>11</sup>	9,20.10 <sup>13</sup>
	22/02/2019	1,70.10 <sup>13</sup>	2,40.10 <sup>7</sup>	1,60.10 <sup>14</sup>
II	02/04/2019	1,60.10 <sup>11</sup>	2,40.10 <sup>7</sup>	1,70.10 <sup>9</sup>
	16/05/2019	1,60.10 <sup>11</sup>	2,80.10 <sup>9</sup>	1,60.10 <sup>14</sup>

Legenda: BOA -Bactéria Oxidadora de Amônia; BON - Bactéria Oxidadora de Nitrito.  
Fonte: Autoria própria.

Para as BOA, a Fase I favoreceu o crescimento dos microrganismos, contudo, as bactérias na Fase II não foram prejudicada com a elevação da COV, manteve-se a mesma concentração. Para as BON, em ambas as fases ocorreram reduções do NMP comparando a data da primeira análise com a data da última análise de cada fase. Para as bactérias desnitrificantes em ambas as fases houve aumento na concentração de bactérias, com tudo, na Fase II o aumento foi maior em relação a primeira fase.

É possível observar os resultados de UFC das bactérias heterotróficas em cada uma das condições na Tabela 2.

Tabela 2 - Média da UFC/mL das Heterotróficas no material suporte nas duas fases operadas (Fase I e II)

FASE	DATA	Heterotrófica (UFC/mL)
I	14/12/2018	9,23.10 <sup>13</sup>
	22/02/2019	1,77.10 <sup>14</sup>
II	02/04/2019	1,62.10 <sup>11</sup>
	16/05/2019	1,60.10 <sup>14</sup>

Fonte: Autoria própria.

Para as bactérias Heterotróficas os resultados de ambas as fases foram semelhantes, a concentrações dos microrganismos no final de cada fase foram

bem próximos, evidenciando mais uma vez que o aumento da COV não prejudica o desenvolvimento dessas bactérias e consequentemente a atividade microbiana deste grupo de microrganismos.

Considerando o número total de microrganismos presentes no MS, que são os responsáveis pela formação do biofilme, as duas fases obtiveram números totais semelhantes, comprovando que é possível elevar a COV e manter a estabilidade do sistema.

Na Tabela 3 é possível observar as concentrações encontradas de Polissacarídeo Total e Proteína Total durante as duas fases de operação do sistema.

Tabela 3 - Concentração (mg/L) de Polissacarídeo Total (PS) e Proteína Total (PT) durante a Fase I e II no Material Suporte (MS)

DATA	FASE	Concentração (mg/L)	
		Polissacarídeo Total (PS)	Proteína Total (PT)
14/12/2018	I	25,2	22,2
22/02/2019		77,3	34,4
02/04/2019	II	81,7	3,0
16/05/2019		109,0	17,7

Fonte: Autoria própria.

Na Fase I obteve-se um aumento de 307% e 155% na concentração (mg/L) de PS e PT, respectivamente, enquanto na Fase II o aumento foi de 133,4% na concentração de PS e 590% na concentração de PT.

É possível notar que independentemente da elevação do COV, a formação do biofilme ocorreu aumentando suas concentrações de PS e PT em ambas as fases.

## CONCLUSÃO

De modo geral pode-se concluir que o aumento da Carga Orgânica Volumétrica não inibiu a formação do biofilme e não foi prejudicial para a atividade das bactérias responsáveis pela formação do biofilme, sendo possível elevar as concentrações de carga orgânica para 1,4 KgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> em efluentes de laticínio num reator de leito estruturado e fluxo contínuo.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de iniciação científica. A PROPPG por possibilitar a oportunidade de participar do programa de iniciação científica e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo aporte financeiro da parte experimental.

## REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.

CALIJURI, M.C.; Alves, M.S.A. & Santos, A.C.A. 2006. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos-SP: Rima; Brasília: CNPq.

CAMMAROTA, M. C. **Produção de exopolímeros e adesão microbiana**, Tese de D.Sc, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

CORREA, C. Z. **Reator de leito estruturado com recirculação submetido à aeração intermitente no tratamento de esgoto sanitário**. 2015 Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

DUBOIS, M. et al. **Colorimetric method for determination of sugars and substance**. Anal chem, v. 28, p. 350-356, 1956.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário Leite – 2018**.

EPA. **Manual: Nitrogen Control**. UnitedStates Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1993.

HURLOW, J., et al. **Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care**. **Advances in wound care**, v. 4, n. 5, p. 295-301, 2015.

MENDONÇA, L. C. **Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

METCALF & EDDY. Inc. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. Tata McGraw-Hill Edition, 2003.

MOURA, R. B. D. E. **Desempenho de um reator vertical de fluxo contínuo e leito estruturado com recirculação do efluente, submetido à aeração intermitente, na remoção de carbono e nitrogênio de um efluente sintético**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2011.

SCHMIDT, E. L. E BELSER, L. W. Nitrifying Bacteria, **In: Methods of Soil Analysis – Chemical and Microbiological Properties**, Wisconsin, Estados Unidos, 1984.