

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Produção do probiótico *Saccharomyces boulardii*  
em efluente de arroz parboilizado e avaliação da  
biorremediação**

**Giana Carla Gaboardi**

Pelotas, 2015.

**GIANA CARLA GABOARDI**

**Produção do probiótico *Saccharomyces boulardii* em  
efluente de arroz parboilizado e avaliação da  
biorremediação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia Ambiental).

**Orientador: Dr. Fabricio Rochedo Conceição**

**Co-orientador(es): Dr. Diego Gil de los Santos**

**Dr. João Rodrigo Gil de los Santos**

Pelotas, 2015.

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

G116p

Gaboardi, Giana Carla

Produção do probiótico *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado e avaliação da biorremediação / Giana Carla Gaboardi. – 63f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador Fabrício Rochedo Conceição ; coorientadores Diego Gil de los Santos, João Rodrigo Gil de los Santos.

1.Biotecnologia. 2.Efluentes. 3.DQO. 4.Parboilização. 5.Arroz parboilizado. 6.*Saccharomyces boulardii*. 7.Fósforo. 8.Nitrogênio. I.Conceição, Fabrício Rochedo. II.Gil de los Santos, Diego. III.Gil de los Santos, João Rodrigo. IV.Título.

CDD: 633.18

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição (Orientador - UFPel, CDTec/Biotecnologia)

Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira (UFPel, CCQFA)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Diaz de Oliveira (UFPel, CDTec/Biotecnologia)

Prof. Dr. Wagner David Gerber (IFSul, Departamento de Química)

Dedico, com amor e gratidão,  
aos meus pais.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de fazer o mestrado, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Ao Instituto Federal Sul-rio-grandense por possibilitar a realização de algumas análises em laboratórios da instituição.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, professor Fabricio Rochedo Conceição, por ter aceitado me orientar e pela oportunidade de fazer parte do laboratório de Imunologia Aplicada. Pelo incentivo, ensinamentos, paciência e conselhos, muito obrigada.

Ao meu co-orientador Diego Gil de los Santos, por todos os ensinamentos, pela orientação na execução do projeto, por sempre estar pronto para ajudar. Muito obrigada pelos conselhos, pela compreensão, pelas palavras de apoio e incentivo, pela paciência, parceria e amizade.

Aos meus pais, Jaime e Cleonice Gaboardi, por todo o apoio e amor, por terem me dado o exemplo de educação, honestidade e humildade. Agradeço por terem me dado a oportunidade de buscar uma educação de qualidade. Por compreenderem todas as vezes em que não pude estar por perto, em momentos de celebração familiar ou nos momentos difíceis, obrigada.

Aos meus irmãos Luiz Inácio e Leonardo, por me receberem sempre com muita alegria e carinho, nos poucos momentos em que podemos estar reunidos.

Ao meu namorado, Arthur Silva, pelo apoio, incentivo, por acreditar no meu potencial, pelos momentos de alegria, pelo amor e companheirismo.

Aos amigos e colegas de laboratório e de pós-graduação Gustavo, Paula, Marcelo, Marcelle, Carol Lopes, Neida, Suely, Carlos, Michele, Rodrigo, Clóvis, Marcus, Luisa, Samantha, Stefani, Rafael e Alexandre, pela ajuda nos experimentos e pela amizade e rotina agradável.

À Larissa, Taiane e Lantier, pela parceria nos experimentos e imensurável ajuda com as análises ambientais realizadas no IFSul Campus Pelotas.

Aos professores e demais colegas e funcionários do Centro de Biotecnologia, obrigada pelo bom convívio, ajuda e suporte.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia (Lab 4) pela gentileza, amizade, pela ajuda com dúvidas e empréstimo de materiais.

Muito Obrigada.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

## Resumo

GABOARDI, Giana Carla. Produção do probiótico *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado e avaliação da biorremediação. 2015. 63f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O Brasil produziu 12,2 milhões de toneladas de arroz em casca na safra 2013/2014, sendo a região sul responsável por 60% da produção. O arroz parboilizado representa 50% das exportações nacionais de arroz e aproximadamente 20% do arroz total comercializado no Brasil. No processo de parboilização, são gerados 2 L de efluente para cada quilograma de grão processado, gerando grandes volumes de efluente que contém nutrientes, como nitrogênio e fósforo, e matéria orgânica. As metodologias de tratamento utilizadas para o tratamento deste efluente são as lagoas aeróbias e anaeróbias, lodos ativados, precipitação química e reatores UASB. O cultivo de leveduras em efluentes tem sido empregado como forma de tratamento, gerando simultaneamente biomassa que pode ser usada como probiótico ou fonte de proteína unicelular. A levedura *Saccharomyces boulardii* é capaz de crescer em efluente de arroz parboilizado quando este é suplementado com uma fonte extra de carbono. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de *Saccharomyces boulardii* no tratamento do efluente de arroz parboilizado e a produção de biomassa. Realizaram-se ensaios para a seleção de um meio de cultivo de *Saccharomyces boulardii*, testando a adição de sacarose ou glicerol de biodiesel ao efluente da parboilização de arroz, coletado em uma indústria de beneficiamento de arroz. Os melhores resultados obtidos foram no cultivo em efluente suplementado com 1% de sacarose, que gerou viabilidade celular de  $2,4 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e a remoção de 72% do fósforo, 50% do nitrogênio (N-NTK) e 56% da demanda química de oxigênio (DQO) em 24 h de cultivo. A partir do meio de cultivo selecionado, analisou-se em biorreator o crescimento e a produção de biomassa da levedura e sua influência na redução de parâmetros ambientais. Após 48 h de cultivo, foi produzido 3,8 g.L<sup>-1</sup> de biomassa e  $1,8 \times 10^{11}$  UFC. L<sup>-1</sup>. A eficiência de remoção foi de 74% da DQO e 78% do fósforo, alcançando as taxas de remoção de fósforo estabelecidas pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA 128/06). Além disso, a biomassa seca produzida e a viabilidade celular alcançada permitiriam obter probiótico suficiente para adicionar a 36 toneladas de ração a cada tonelada de grão processado. Estes resultados ressaltam os benefícios do cultivo de *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado suplementado com sacarose como sistema de tratamento e produção de probiótico.

**Palavras-chave:** efluente de arroz parboilizado, *Saccharomyces boulardii*, nitrogênio, fósforo, DQO.

## Abstract

GABOARDI, Giana Carla. Production of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent and evaluation of bioremediation. 2015. 63f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Brazil produced 12.2 million tons of paddy rice in 2013/2014, and the south region was responsible for 60% of the production. The parboiled rice represents 50% of the national rice exports and about 20% of the total rice sold in Brazil. During the parboiling process are generated 2 liters of effluent per kilo of processed grain, generating large volumes of effluent which contains nutrients such as nitrogen and phosphorus, and organic matter. The treatment methodologies used for the treatment of this effluent are aerobic and anaerobic lagoons, activated sludge, chemical precipitation and UASB reactors. Cultivation of yeasts in wastewater has been used as a treatment technique while generating biomass that can be used as probiotic or unicellular protein source. The yeast *Saccharomyces boulardii* is able to grow in parboiled rice effluent when it is supplemented with extra carbon source. The aim of this study was to evaluate the use of *Saccharomyces boulardii* on treatment of parboiled rice effluent and biomass production. Trials were carried out for the medium selection to *Saccharomyces boulardii* cultivation, testing the addition of sucrose or glycerol by-product of biodiesel industry into parboiled rice effluent, collected in a rice processing industry. The best results obtained were on cultivation in effluent supplemented with 1% sucrose, generating  $2.4 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> of cell viability and phosphorus, nitrogen and COD removal of 72%, 50% and 56%, respectively, after 24 h of culture. After medium selection, the cell growth, yeast biomass production and its influence on the reduction of environmental parameters was analyzed in bioreactor. After 48 h of culture, it was produced 3.8 g L<sup>-1</sup> of biomass and  $1.8 \times 10^{11}$  CFU. L<sup>-1</sup>. The removal efficiency was 74% for COD and 78% for phosphorus, reaching the phosphorus removal rates required by Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA 128/06). Furthermore, the produced dry yeast biomass and cell viability reached would allow to obtain sufficient probiotics to add to 36 tons of feed for each ton of processed grain. These results show the advantages of *Saccharomyces boulardii* cultivation in parboiled rice effluent supplemented with sucrose as a treatment system and production of probiotic.

**Keywords:** parboiled rice effluent, *Saccharomyces boulardii*, nitrogen, phosphorus, COD.

## Lista de Abreviaturas

ABIAP -	Associação Brasileira das Indústrias de Arroz Parboilizado
ANOVA -	Análise de Variância
Cldn -	Claudina
CO <sub>2</sub> -	Dióxido de Carbono
CONAB -	Companhia Nacional de Abastecimento
DNS -	Ácido 3,5 - Dinitrosalisílico
DO -	Densidade óptica
DQO ou COD -	Demanda Química de Oxigênio
EMBRAPA -	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FEPAM -	Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler- RS
IgA -	Imunoglobulina A
IL-6 -	Interleucina - 6
M -	Molaridade ou Molar
MAPA -	Ministério da Pecuária, Agricultura e Abastecimento
mRNA -	RNA mensageiro
N-NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
Ocln -	Ocludina
PAE -	Plantas Aquáticas Emergentes
pH -	Potencial Hidrogeniônico
RBS -	Reator em Batelada Sequencial
RNA -	Ácido Ribonucléico
rpm -	Rotação por minuto
RS -	Rio Grande do Sul
SCP -	<i>Single Cell Protein</i>
TNF- $\alpha$ -	Fator de Necrose Tumoral Alpha
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UFC. mL <sup>-1</sup> ou CFU. mL <sup>-1</sup>	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

UV - Radiação Ultravioleta  
vvm - Volume de ar por volume de meio, por minuto  
YM - *Yeast Medium*  
YPSuc - *Yeast Peptone Sucrose*

## Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 A produção de arroz no Brasil.....	15
2.2 Sistemas de tratamento de efluentes agroindustriais.....	17
2.3 Uso de micro-organismos no tratamento de efluentes: biorremediação e produção de biomassa.....	20
2.4 Uso de leveduras como probióticos na produção animal.....	22
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	25
3.1 Hipótese.....	25
3.2 Objetivo Geral .....	25
3.3 Objetivos Específicos.....	25
4 MANUSCRITO 1 .....	26
4.1 Introdução .....	28
4.2 Material e Métodos.....	29
4.2.1 Micro-organismo .....	29
4.2.2 Efluente.....	29
4.2.3 Glicerol.....	30
4.2.4 Sacarose.....	31
4.2.5 Seleção do meio de cultivo para produção de <i>Saccharomyces boulardii</i> ..	31
4.2.6 Determinação de DQO, N-NTK e P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> na seleção de meios.....	32
4.2.7 Cultivo da levedura em biorreator .....	33
4.2.8 Quantificação da biomassa, viabilidade celular, determinação de sacarose e análise dos parâmetros ambientais das fermentações em biorreator de bancada.....	33
4.2.9 Análise estatística .....	34
4.3 Resultados e Discussão.....	34

4.3.1 Seleção de meios em agitador orbital.....	34
4.3.2 Cultivos em Biorreator .....	43
4.4 Conclusões .....	50
4.5 Referências Bibliográficas.....	51
5 CONCLUSÃO GERAL.....	56
6 REFERÊNCIAS.....	57

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais de arroz. Na safra 2013/2014, a produção nacional foi de 12,2 milhões de toneladas de arroz em casca (CONAB, 2014). O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do país e responsável por 67,7% desta produção. Antes de ser comercializado, este cereal passa por beneficiamento, podendo ser consumido sob três formas: polido, integral e parboilizado (Kawassaki, 2011). O arroz parboilizado representa 20% do total do arroz beneficiado no Brasil (ABIAP, 2009).

A indústria de parboilização é uma das principais atividades agroindustriais da zona sul do estado. O processo de parboilização aumenta o valor nutritivo, o rendimento do engenho e a conservação do produto (Lima, 2003). A cada 1 kg de arroz processado na parboilização, são gerados 2 L de efluente (Gil de los Santos, 2012), rico em substâncias orgânicas e nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo (Faria et al., 2006). Atualmente, os sistemas utilizados para o tratamento do efluente de arroz parboilizado são as lagoas aeróbias e anaeróbias, reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB), lodos ativados, precipitação química e o tratamento com plantas aquáticas emergentes.

A utilização de leveduras já vem sendo explorada em plantas de tratamento de efluentes de indústrias alimentícias (Choi & Park, 2003; Watanabe et al., 2009; Kato & Iefuji, 2011; Watanabe et al., 2013) e em ensaios de tratamento de efluente em escala laboratorial (González-Garcia et al., 2011; Huang et al., 2014; Ling et al., 2014), com o objetivo simultâneo de reduzir o impacto ambiental e produzir biomassa e proteína unicelular para diversas aplicações. No tratamento do efluente de arroz parboilizado, Gil de los Santos et al. (2012a) obtiveram diminuição das concentrações de nitrogênio, fósforo e DQO com o cultivo de *Pichia pastoris* X-33 no efluente de arroz parboilizado suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel.

O glicerol bruto é um subproduto gerado durante a transesterificação de óleos vegetais para a obtenção de biodiesel. Estudos têm sido direcionados para a conversão deste substrato em materiais de maior valor agregado (Chatzifragkou et al., 2011). Desta maneira, sua utilização como fonte extra de carbono é uma

alternativa interessante na biorremediação do efluente de arroz parboilizado por leveduras e produção de biomassa.

*Saccharomyces boulardii* é uma levedura originalmente isolada de líchias, na Indochina, que é utilizada comercialmente há mais de 50 anos, devido às suas propriedades probióticas, para o tratamento de distúrbios intestinais, causados por patógenos ou pelo uso de antibióticos, promovendo o restabelecimento da microbiota intestinal (Czerucka & Rampal, 2002; Edwards-Ingram et al., 2007). Em animais, diversos estudos já comprovaram o efeito probiótico e prebiótico da introdução desta levedura na alimentação (Coppola et al., 2005; Gil de los Santos et al., 2005; Lessard et al., 2009; Badia et al., 2012; Rajput et al., 2013). Schneid et al. (2004) demonstraram que o efluente de arroz parboilizado pode ser usado para a produção das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*, sendo possível gerar biomassa de  $10^{11}$  UFC.L<sup>-1</sup> com a adição de fonte extra de carbono ao efluente. A sacarose é um açúcar que apresenta vantagens como baixo custo e produção nacional abundante (Kawagati & Sato, 2008) e que pode ser utilizado para este fim. Além disso, é amplamente utilizada como substrato na produção de leveduras para panificação e nas indústrias de etanol e bebidas alcoólicas (Barford et al., 1995).

Neste trabalho, buscou-se desenvolver em escala laboratorial uma tecnologia que permita o cultivo de probióticos em efluentes e remoção de matéria orgânica e nutrientes destes pela incorporação na biomassa. Avaliou-se potencial da levedura *Saccharomyces boulardii* como micro-organismo biorremediador, através do seu cultivo em efluente oriundo do processo de parboilização de arroz suplementado com fontes adicionais de carbono com pouco valor agregado ou de baixo custo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A produção de arroz no Brasil

O arroz é um grão de alto valor econômico e está entre os cereais mais consumidos no mundo. Em muitos países em desenvolvimento, o arroz é considerado o cultivo alimentar de maior importância, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. Cerca de 2,4 bilhões de pessoas tem este grão como alimento básico na dieta e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população (EMBRAPA, 2005).

O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína diária necessária ao homem, e sendo uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate da fome mundial (EMBRAPA, 2005).

O Brasil é o nono maior produtor mundial, sendo o maior produtor de fora do continente asiático, e colheu 12,2 milhões de toneladas na safra 2013/2014, superando em 3,5% a obtida no ano anterior, com rendimento médio de 5.168 kg/ha. A produção está distribuída principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso. O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do país e responsável por 67,7% desta produção. As áreas de cultivo no estado não apresentam grande variação normalmente, já que são sistematizadas para esse fim, predominando a produção irrigada (IBGE, 2014). Cerca de 54% das áreas plantadas nacionais estão no Rio Grande do Sul, chegando a 1,1 milhão de hectares na safra 2013/2014 (CONAB, 2014) .

Antes de ser comercializado, o arroz é submetido ao processo de beneficiamento, no qual passa por diversos processos até estar pronto para o consumo. O arroz beneficiado pode ser consumido em três formas: polido, parboilizado polido e integral (Kawassaki, 2011).

No Brasil, o arroz é consumido e comercializado principalmente na forma polida, sendo as outras formas de beneficiamento comercializadas em menor

escala. O arroz parboilizado representa 20% do total do arroz beneficiado no Brasil (ABIAP, 2009) e mundialmente, estima-se que 170 milhões de toneladas de arroz em casca sejam beneficiadas e passem por parboilização por ano, representando um quinto de toda a produção mundial (Amato & Elias, 2005 *apud* Kawassaki, 2011).

A parboilização do arroz é um processo hidrotérmico no qual os grãos passam por um encharcamento em água potável a uma temperatura superior a 58 °C, aquecimento em autoclave ou forno para a gelatinização parcial ou total do amido e secagem, seguida ou não de beneficiamento. Este processo garante inúmeros benefícios tecnológicos, como maior rendimento devido ao soldamento dos grãos quebrados, inativação enzimática, menor taxa de contaminação por micro-organismos e maior “vida de prateleira” (Amato & Elias, 2005 *apud* Kawassaki, 2011; Heinemann et al., 2005). A gelatinização do amido promove modificações nos grânulos de amido presentes nas células do endosperma. Após esta etapa, o esfriamento e secagem dos grãos causa o fenômeno chamado retrogradação, com reassociação das moléculas amiláceas, o que deixa o grão mais opaco (Storck et al. 2005).

Durante a parboilização do arroz, também ocorrem mudanças nas propriedades químicas e organolépticas. No encharcamento do arroz, a água aquecida dissolve substâncias hidrossolúveis, como vitaminas e sais minerais, arrastando-as da periferia para o centro, com fixação no interior dos grãos. As moléculas de óleo têm sua viscosidade reduzida com o aumento da temperatura, favorecendo seu transporte para o interior dos grãos (Elias et al., 1998).

O processo de encharcamento origina águas residuárias com altas cargas de substâncias orgânicas, nitrogênio na forma amoniacal e nitrogênio orgânico, fosfatos e outros nutrientes (Faria, 2006). A cada tonelada de grãos que passam por encharcamento, são gerados dois metros cúbicos de efluente (Gil de los Santos, 2012). Assim, é necessário uma etapa de tratamento deste efluente antes de seu descarte nos corpos receptores, para evitar prejuízos ao meio ambiente.

A remoção de nutrientes tem sido estudada por várias técnicas. Busca-se uma tecnologia ideal, que combine alta eficiência de remoção com menor consumo energético, menor área ocupada e possibilidade de reaproveitamento da energia na forma de biogás e reuso da água (Faria et al., 2005).

Para o tratamento do efluente de parboilização, o efluente bruto passa por um sistema de gradeamento grosseiro, através de uma peneira hidrodinâmica, em seguida por um tanque de equalização e é alimentado a um reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB). A temperatura de emissão destes efluentes varia em torno de 55°C e o efluente chega ao reator com 45°C, o que obriga a um resfriamento para o tratamento biológico anaeróbio não termofílico. A temperatura do efluente do equalizador é reduzida para 32 °C em torre de resfriamento. Do reator anaeróbio, o fluxo vai para um tanque anóxico de desnitrificação do qual passa para o reator aeróbio do tipo lodo ativado. Deste reator, o efluente nitrificado é recirculado para o reator anóxico. O efluente do reator aeróbio é descarregado no decantador secundário, do qual a biomassa retorna ao reator aeróbio e o efluente clarificado é descarregado no corpo receptor (Koetz et al., 2005). Porém, outros métodos também são utilizados para seu tratamento, podendo-se destacar as lagoas aeróbias e anaeróbias, precipitação química e o tratamento com plantas aquáticas emergentes (Gerber, 2002; Faria 2006).

Dentre os compostos a serem removidos, o fósforo ainda é o mais problemático, por ter a menor eficiência de remoção comparada aos demais poluentes, sendo necessário, muitas vezes, usar mais de um tipo de tratamento para atender às exigências de emissão no ambiente dos órgãos fiscalizadores. Além disso, o fósforo é o principal elemento responsável pela eutrofização da água (Ancheng et al., 2002).

A remoção de matéria orgânica e nitrogênio dentro dos limites estabelecidos já é alcançada por algumas tecnologias já consolidadas, como reatores anaeróbios e lodos ativados, ao contrário do fósforo, cuja concentração de até 100 mg.L<sup>-1</sup> impossibilita a remoção por processos biológicos simples. Os processos físico-químicos de remoção de fósforo são descrições de literatura em escala de bancada e de planta piloto e os problemas associados a estes tratamentos são a alta quantidade de lodo gerado e o uso de reagentes químicos em grande quantidade (Lima, 2003).

## **2.2 Sistemas de tratamento de efluentes agroindustriais**

As agroindústrias produzem grande quantidade de efluentes, que contém várias substâncias, principalmente matéria orgânica proveniente do processamento de alimentos de origem vegetal e animal. Os resíduos agroindustriais são gerados

no processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar e álcool, café, grãos, etc., sendo sua produção, geralmente, sazonal e condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima (Frasson, 2011).

O efluente gerado no processamento de produtos de origem vegetal podem conter, além de elevado conteúdo de material orgânico, outros poluentes, tais como minerais que fazem parte do solo de onde a cultura foi colhida, restos de vegetais e pesticidas (Frasson, 2011).

A escolha entre as formas de tratamento de efluentes agroindustriais vai depender dos custos operacionais, clima, legislação, classe do corpo receptor, disponibilidade de área junto à fonte geradora da água residuária, taxa de geração do resíduo, velocidade exigida no tratamento do resíduo, e localização (distância de áreas residenciais), direção dos ventos, estabilidade do terreno, disponibilidade de assistência técnica e controle operacional (Giordano, 2003).

Lagoas de estabilização aeradas, facultativas ou anaeróbias são alternativas de tratamento de poluentes. Consistem em grandes tanques escavados no solo, nos quais as águas residuárias são tratadas por processos naturais controlados unicamente pela vazão dos efluentes, além da eventual dosagem de produtos químicos para ajuste de pH ou de nutrientes. As lagoas anaeróbias são dimensionadas para receber elevadas cargas orgânicas e funcionam sem oxigênio dissolvido. As facultativas possuem uma camada superior, com o desenvolvimento de algas e microrganismos aeróbios que convivem em simbiose. Enquanto as algas realizam a fotossíntese, consumindo o gás carbônico e liberando o oxigênio, os micro-organismos oxidam a matéria orgânica, utilizando o oxigênio e liberando o gás carbônico. Na camada do fundo, o processo se comporta como na lagoa anaeróbica. As aeróbicas são semelhantes às facultativas, entretanto, são bem rasas, e assim, não há depreciação de oxigênio no fundo da lagoa, e, conseqüentemente, de micro-organismos anaeróbios (Pereira & Freitas, 2012).

O uso de lagoas de estabilização tem sido frequente para o tratamento de águas residuárias ricas em material orgânico, sendo muito adequadas no caso de efluentes agroindustriais. Estas são unidades especialmente construídas com a finalidade de tratar águas residuárias por meios predominantemente biológicos, isto é, por ação de micro-organismos naturalmente presentes no meio, e podem ser

classificadas, de acordo com o tipo de tratamento, em: anaeróbia, facultativa, de maturação ou aeróbia e aerada (com uso de aeração mecânica) (Matos, 2005).

Dentre os processos biológicos aeróbios, o sistema de lodos ativados é o mais utilizado no tratamento de águas residuárias (Mendonça, 2002) e consiste em provocar o desenvolvimento de uma cultura microbiológica na forma de flocos (lodos ativados) em um tanque com aeração mecânica, durante o tempo necessário para a metabolização da matéria orgânica presente no efluente a ser tratado. Após esta etapa, o material é enviado continuamente a um decantador que separa o efluente tratado do lodo. O lodo é recirculado ao tanque de aeração a fim de manter a concentração de micro-organismos ideal ao tratamento. O sobrenadante do decantador é o efluente tratado, pronto para ser descartado no corpo receptor. Este lodo pode então ser desidratado, tendo como possível aplicação a adubação de culturas agrícolas (Jenkins et al., 2003 *apud* Pereira & Freitas, 2012).

Outro sistema que ganhou espaço por apresentar várias vantagens é o de tratamento anaeróbio, mais especificamente, o tratamento anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo, conhecido como reator UASB (Silveira et al., 2007). Estes reatores possuem retenção de biomassa microbiana no compartimento de reação, onde se desenvolve uma manta de lodo, que é atravessada pelo efluente, e uma recirculação de parte da biomassa, que é carregada pela fase líquida efluente desse compartimento. Esta recirculação é alcançada por meio de sua sedimentação no compartimento de decantação, seguida de retorno, por simples gravidade, para o compartimento de reação (Von Sperling et al., 2000).

O tratamento de efluentes utilizando reator UASB constitui um método eficiente e de custo relativamente baixo, para a remoção de matéria orgânica e de sólidos em suspensão, diminuindo consideravelmente o potencial poluidor dos efluentes após o tratamento. As grandes vantagens de um UASB são a sua eficiência de remoção de matéria orgânica e de sólidos, além de um curto tempo de tratamento quando comparado a sistemas de lodo ativado e lagoas de estabilização (Bezerra, 1998). Entretanto, esse tipo de reator também apresenta algumas desvantagens, como sua baixa eficiência quanto à remoção de patógenos e nutrientes. Assim, a fim de otimizar esse tipo de tratamento, utiliza-se uma combinação deste com lagoas de estabilização, podendo-se assim, obter um

efluente de boa qualidade higiênica em um sistema que ocupa menos que a metade da área necessária para um sistema de lagoas convencionais (Dixon et al., 1995).

A combinação do UASB com um sistema de lodos ativados também é uma alternativa, pois permite obter uma melhor qualidade do efluente final, com menos da metade do volume de reatores, da produção de lodo e do consumo de oxigênio de um sistema convencional de lodos ativados. Dessa maneira, a utilização de reatores do tipo UASB deve ser precedida de um tratamento em lagoas de estabilização ou de lodos ativados, para que o processo seja otimizado (Pereira & Freitas, 2012).

### **2.3 Uso de micro-organismos no tratamento de efluentes: biorremediação e produção de biomassa**

Diversas espécies de micro-organismos já foram caracterizadas como agentes biorremediadores. A escolha da espécie a ser utilizada depende do tipo de contaminante presente na água residuária, visto que a maquinaria metabólica e as enzimas produzidas são distintas entre os micro-organismos. De maneira simplificada, o processo de biorremediação consiste da degradação de compostos tóxicos como contaminantes por micro-organismos, através de reações enzimáticas, resultando em substratos acessíveis para a absorção e incorporação no metabolismo microbiano, para suprir necessidades da célula, ou conversão destes poluentes em produtos menos tóxicos ou compostos de interesse. No tratamento de águas residuárias agroindustriais, inúmeros estudos já foram descritos utilizando bactérias, fungos, algas e leveduras como agentes de degradação de poluentes.

O tratamento de efluente de uma indústria de papel de casca de arroz e trigo com um consórcio bacteriano autóctone resultou em redução de 65% a 85% da demanda química de oxigênio (DQO), e os isolados foram posteriormente identificados como sendo dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pannonibacter* e *Ochrobacterum* (Kumar et al., 2012).

Em vinícolas, pela primeira vez foi reportado o tratamento de águas residuárias com as leveduras *Filobasidium* e *Cryptococcus laurentii*, que se destacaram frente a diversos isolados pela remoção de aproximadamente 90% de polifenóis totais e da demanda química de oxigênio (Santos et al., 2014).

O emprego de leveduras no tratamento de efluentes contendo metais pesados também tem sido explorado, devido à ineficácia dos sistemas físicos e químicos utilizados atualmente e a necessidade de novas alternativas para este poluente que não é degradado e pode permanecer por tempo indefinido no ambiente. Como exemplo, diversos testes utilizando biomassa viva ou morta de *Saccharomyces cerevisiae* para a captação destes metais já foram e continuam a ser realizados (Soares & Soares, 2012).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é produzida em quantidades elevadas como um subproduto da indústria cervejeira, constituindo uma matéria-prima barata. A biorremediação de efluentes industriais contendo metais pesados aparece como uma possibilidade de valorizar este tipo de biomassa. Dada a capacidade de auto-agregação (floculação), as células de *S. cerevisiae* permitem uma separação rápida e barata após o tratamento do efluente, o que reduz os custos associados com o processo, ligados com a recuperação seletiva de metais, em uma estratégia de minimização simultânea de risco ambiental de resíduos industriais com benefícios financeiros de revenda ou reciclagem dos metais (Soares & Soares, 2013).

Leveduras oleaginosas como *Rhodospiridium toruloides* também possuem potencial para a produção de biocombustíveis e tratamento de efluentes industriais. Cultivos realizados em efluentes de destilarias sem a adição de fontes nutritivas adicionais, sem esterilização e ajuste de pH demonstraram alta produção de lipídeos (3,4 g/L) e de remoção de nitrogênio (46%), fósforo (86%) e DQO (91%) em tempo de cultivo relativamente pequeno (três dias) (Ling et al., 2013; Ling et al., 2014).

Além disso, leveduras são comumente empregadas como fonte de proteína unicelular, pois apresentam rápido crescimento e em meios simples, alto valor nutricional, não são patogênicas ou tóxicas e fornecem concentrações satisfatórias de aminoácidos essenciais. Também se caracterizam por serem células ricas em vitaminas, principalmente do grupo B e possuem vantagens sobre células bacterianas por serem maiores, facilitando a separação (Chalón et al., 2013).

No Japão, desde a década de 70 são utilizados métodos de tratamento aeróbio de efluentes utilizando uma combinação de leveduras e lodo ativado, que removem grandes quantidades de compostos orgânicos e exigem pequenos espaços, sendo bastante aplicado na indústria de bebidas (Yoshizawa, 1978 *apud*

Watanabe et al., 2013). Este sistema tem sido utilizado experimentalmente desde então, para o estudo de tratamento de outros efluentes por diversas espécies, como na remediação de efluente da produção de *shochu*, uma bebida japonesa, por uma cepa mutante de *Candida utilis* com alta capacidade de acumular nitrogênio (Watanabe et al., 2013).

Em indústrias de alimentos, a utilização de leveduras para o tratamento de águas residuárias, além de diminuir o impacto ambiental, também gera biomassa e proteína unicelular para diversas finalidades (Nigam, 1999; Choi & Park, 2003; Watanabe et al., 2009; Gélinas & Barrete, 2007).

Em estudos realizados com *Pichia pastoris* X-33, o efluente de arroz parboilizado adicionado de glicerol subproduto da indústria de biodiesel foi utilizado como meio de cultivo, gerando biomassa usada como probiótico para frangos de corte e redução de nitrogênio, fósforo e DQO do efluente após o cultivo (Gil de los Santos, 2012). Este efluente também já foi utilizado para cultivos com outras leveduras (Rodrigues & Koetz, 1996), microalgas e cianobactérias (Queiroz et al., 2007; Zepka et al., 2008) buscando redução de parâmetros ambientais e incorporação destes na biomassa produzida.

#### **2.4 Uso de leveduras como probióticos na produção animal**

A principal meta da produção pecuária é a produção de alimentos seguros para o consumidor, levando em conta o bem estar dos animais e a preservação do ambiente. Para isso, profissionais da zootecnia estão constantemente em busca de qualidade e segurança (Gaggía et al., 2010).

Estimulada pela crescente preocupação em relação ao desenvolvimento de resistência a antimicrobianos e possibilidade de transferência de genes de resistência entre a microbiota animal e humana (Mathur & Singh, 2005), a proibição do uso de antibióticos em quantidades subterapêuticas pela União Européia em 2006 causou transtornos no sistema de produção animal e ainda é motivo de preocupação para os produtores, afetando as produções brasileiras voltadas à exportação.

Portanto, há a necessidade de um substituto viável que fortaleça as defesas naturais dos animais e contribua para seu desempenho. Este resultado pode ser alcançado através da modulação da microbiota intestinal, que desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde do hospedeiro, formando uma barreira contra a colonização de patógenos e estimulando o sistema imune por vias não-inflamatórias (Tuohy et al., 2003). Nesse contexto, os probióticos vêm sendo cotados como substitutos à altura para os antibióticos, visando manter os níveis desejáveis de desempenho. São capazes de conferir proteção frente a patógenos, exercendo as funções antes conferidas pelo uso do antibiótico como promotor de crescimento.

O conceito mais utilizado para probiótico é “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Dentre as ações dos micro-organismos probióticos pode-se citar: manutenção da microbiota intestinal e da função da barreira gastrointestinal, expressão de bacteriocinas, produção de enzimas que melhoram a absorção e nutrição, efeitos imunomodulatórios, inibição de enzimas procarcinogênicas e interferência na colonização da mucosa intestinal por patógenos (Gaggia et al., 2010).

Leveduras podem ser usadas como prebióticos ou probióticos quando adicionadas à ração, melhorando a eficiência alimentar, a imunomodulação ou a microbiota intestinal e diminuindo a translocação bacteriana (Gil de los Santos et al., 2005; Gil de los Santos et al., 2012b).

Leveduras como *S. boulardii* (Gil de los Santos et al., 2005; Roos et al., 2010) e *Pichia pastoris* KM71H (Gil de los Santos et al., 2012) exercem efeito probióticos que podem propiciar um aumento da produtividade na avicultura e ovinocultura. A administração de *Saccharomyces boulardii* pode aumentar a resposta imune humoral contra coccidiose em frangos (Lee et al., 2007) e exercer efeito imunomodulatório em suínos, após infecção com *Escherichia coli* ETEC, segundo Lessard et al. (2009), por aumentar a secreção de IgA e o estabelecimento de linfócitos no intestino e diminuir a translocação bacteriana.

Em frangos, a administração de *S. boulardii* aumentou os níveis de expressão de mRNA de *ocln*, *cldn2* e *cldn3*, que codificam para proteínas que viabilizam a junção entre as células, no jejuno e íleo dos animais. Também potencializaram a

produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  e de anticorpos IgA na mucosa intestinal (Rajput et al., 2013).

Em ruminantes, os estudos com probióticos têm como alvo a fase pré-ruminante e de ruminante adulto, avaliando-se o efeito nos parâmetros econômicos e no estado de saúde. Terneiros alimentados com leite fermentado com uma mistura de bactérias ácido-láticas ou *Saccharomyces cerevisiae* NCDC49 tiveram menor incidência de diarreia (Agarwal et al., 2002). A incorporação de leveduras vivas na alimentação destes animais também diminui o número de dias com diarreia.

Em gado de leite, a suplementação alimentar com leveduras viáveis aumentou parâmetros de desempenho como consumo de matéria seca, produção de leite (Jouany, 2006; Stella et al., 2007), digestibilidade de matéria orgânica, pH do rúmen e a concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen (Desnoyers et al., 2009).

A suplementação da dieta animal com prebióticos e probióticos é vista como uma opção atraente para o setor zootécnico. Buscar alternativas que permitam suprir as funções dos antibióticos torna-se importante, a fim de evitar o comprometimento da produção de alimentos de origem animal. Neste panorama, torna-se atrativo desenvolver uma tecnologia de produção de probióticos para uso agropecuário a partir de efluentes e resíduos industriais, que permitam o tratamento deste efluente e também o incremento da produção animal sem gastos significativos ao produtor.

### 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótese

O cultivo da levedura *Saccharomyces boulardii* produzida em efluente de arroz parboilizado suplementado com fonte extra de carbono promove remoção de nitrogênio e fósforo e da demanda química de oxigênio (DQO), produzindo biomassa em concentração e viabilidade adequados para seu uso como probiótico.

#### 3.2 Objetivo Geral

Avaliar a produção da levedura *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado e o impacto deste cultivo nos níveis de nitrogênio, fósforo e DQO no efluente.

#### 3.3 Objetivos Específicos

- Selecionar o meio que possibilite o cultivo de *Saccharomyces boulardii*, composto de efluente do processo de parboilização do arroz suplementado com diferentes fontes complementares de carbono,
- Avaliar a viabilidade celular e os percentuais de remoção de nitrogênio total, demanda química de oxigênio (DQO) e fósforo total do efluente de arroz parboilizado;
- Produzir em biorreator o probiótico *S. boulardii*, utilizando o meio de cultivo selecionado e avaliar o percentual de remoção de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica do efluente de arroz parboilizado.

#### 4 MANUSCRITO 1

**Biorremediação e produção de biomassa a partir do cultivo do  
probiótico *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado**

(Manuscrito formatado conforme as normas da revista Journal of Biotechnology)

Biorremediação e produção de biomassa a partir do cultivo do probiótico *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado

## Resumo

A parboilização de arroz gera 2 L de efluente por quilograma de grão processado. Diversas metodologias já foram testadas almejando reduzir o impacto ambiental deste efluente. O objetivo deste estudo foi avaliar a biorremediação do efluente de arroz parboilizado suplementado com sacarose ou glicerol residual da produção de biodiesel após o cultivo do probiótico *Saccharomyces boulardii*. A adição de 1% de sacarose propiciou os melhores resultados de remoção de nitrogênio, fósforo, DQO e viabilidade celular em ensaios em agitador orbital. Cultivos em biorreator utilizando este meio geraram 3,8 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, 1,8 x 10<sup>11</sup> UFC. L<sup>-1</sup> e remoção de 74% da DQO e 78% do fósforo. Estes resultados ressaltam os benefícios do cultivo de *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado como sistema de tratamento e produção de probiótico.

Palavras - chave: efluente de arroz parboilizado; *Saccharomyces boulardii*, sacarose; fósforo; DQO

## Abstract

The rice parboilization generates 2 liters of effluent per kilo of processed grain. Many methodologies have been tested to reduce the environmental impact of this effluent. The aim of this study was to evaluate the bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with sucrose or residual glycerol of biodiesel production after culture of probiotic *Saccharomyces boulardii*. The addition of 1% sucrose provided the best results for nitrogen, phosphorus and COD removal and cell viability in orbital shaker assays. Bioreactor cultivations using this medium produced 3.8 g.L<sup>-1</sup> of biomass, 1,8 x 10<sup>11</sup> CFU.L<sup>-1</sup> and removed 74% of COD e 78% of phosphorus. These results show the benefits of *Saccharomyces boulardii* cultivation in parboiled rice effluent as treatment and probiotic production system.

Key words: parboiled rice effluent; *Saccharomyces boulardii*; sucrose; phosphorus; COD

## 4.1 Introdução

O arroz é alimento básico para mais da metade da população mundial (FAO, 2013). Na safra 2013/2014, o Brasil produziu 12,2 milhões de toneladas de arroz em casca (CONAB, 2014), sendo a região sul responsável por 60% da produção. O arroz parboilizado representa 50% das exportações nacionais de arroz (ABIAP, 2009) e aproximadamente 20% do arroz total comercializado no Brasil. Para o processo de parboilização do arroz são necessários 2 L de água por kg de grão processado, o que resulta em bilhões de litros de efluente por ano, que é rico em matéria orgânica e nutrientes, como nitrogênio e fósforo (Queiroz e Koetz, 1997) e necessita de tratamento antes do descarte.

Nas indústrias de parboilização de arroz, o efluente saído dos tanques de maceração é tratado através de sistemas formados por reatores anaeróbios e por lodos ativados. Estas tecnologias geralmente se mostram satisfatórias, mas exigem altos investimentos e espaço amplo para a operação. Reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB) tem uma larga aceitação em razão da comprovada eficiência na remoção de carga orgânica de diversos efluentes. Entretanto, são ineficazes na remoção de nutrientes, normalmente necessitando de tratamento complementar para se adequar às exigências de fiscalização (Schulz, 2009).

Diversas técnicas de tratamento vêm sendo exploradas experimentalmente para o tratamento deste tipo de efluente, como a utilização de plantas aquáticas emergentes (Gerber, 2002), reatores em batelada sequencial de ciclos anaeróbios e aeróbios (Faria et al., 2006), processos simultâneos de nitrificação e desnitrificação (Isoldi et al., 2005) e cultivos de algas e leveduras (Rodrigues e Koetz, 1996; Queiroz et al., 2007). O cultivo de *Pichia pastoris* X-33, uma levedura com potencial probiótico, no efluente de arroz parboilizado suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol subproduto da indústria de biodiesel reduziu 55% da DQO, 45% do nitrogênio e 52% do fósforo do efluente (Gil de los Santos et al., 2012). Este resultado demonstra o potencial da aplicação de sistemas simultâneos de produção de probióticos e proteína unicelular a partir do tratamento de efluentes. A utilização do glicerol de biodiesel como fonte de carbono para a produção de leveduras pode ser uma alternativa para os grandes volumes gerados anualmente pela indústria de biodiesel,

que está em constante crescimento devido à necessidade de fontes de energia renováveis (Chatzifragkou et al., 2011).

A levedura *Saccharomyces boulardii* possui propriedades probióticas, sendo o seu uso já consolidado em humanos e animais. Estudos realizados com animais de experimentação e frangos já apontaram os efeitos probiótico e prebiótico desta levedura (Copolla et al., 2005; Gil de los Santos et al., 2005; Rajput et al., 2014). Schneid et al. (2004) demonstraram que *S. boulardii* pode ser cultivada no efluente de arroz parboilizado adicionando 1% de sacarose ao efluente obtido de ensaios de parboilização efetuados em laboratório. A sacarose é uma fonte de carbono barata e abundante no Brasil, que pode ser utilizada como fonte complementar em meios de cultivo.

Neste estudo, foi comparado o crescimento da levedura *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado suplementado com sacarose ou glicerol oriundo da produção de biodiesel buscando selecionar o melhor meio de cultivo e o impacto na remoção de DQO, nitrogênio e fósforo desse efluente. No meio selecionado, avaliou-se em biorreator a viabilidade celular, a produção de biomassa e a cinética de remoção em parâmetros ambientais.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Micro-organismo**

*Saccharomyces boulardii* foi obtida de uma cápsula de Floratil®, pela reativação do liofilizado, que foi cultivado em 10 mL de meio YM por 24 h a 150 rpm e 28 °C. Após o cultivo, foi realizada a semeadura de uma gota da cultura em placas de YM sólido, e incubação por 48 h em estufa a 28 °C, para crescimento e isolamento das colônias. As placas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C e repicadas a cada 15 dias.

### **4.2.2 Efluente**

O efluente dos tanques de maceração de uma indústria de beneficiamento de arroz localizada em Pelotas (RS) foi coletado no mês de janeiro de 2013, por três

dias consecutivos. As três coletas foram misturadas e homogeneizadas, para uso nos ensaios de seleção de meios. Após homogeneização, o efluente foi esterilizado a 121 °C por 45 min e mantido sob refrigeração a 4 °C até seu uso. Para os cultivos em biorreator de bancada, foi realizada nova coleta de efluente, em agosto de 2013, por três dias consecutivos, seguindo as mesmas condições de homogeneização e esterilização utilizadas na coleta anterior.

#### **4.2.3 Glicerol**

O glicerol de biodiesel utilizado é proveniente de uma indústria de biodiesel obtido a partir do processamento da soja da cidade de Rosário do Sul (RS). As características do glicerol de biodiesel utilizado estão especificadas na Tabela 1:

Tabela 1. Composição do glicerol de biodiesel utilizado como fonte extra de carbono nos ensaios de seleção de meios.

Parâmetro	Valor	Unidade	Método
Voláteis	26,6	% massa	AOCS C <sub>a</sub> 2c-25
Alcalinidade combinada	1,8	% massa	AOCS C <sub>c</sub> 17-95
Metanol	1,37	% massa	EN 14110
Cinzas	5,3	% massa	ASTM D 874
Massa Específica	1,3	g.cm <sup>-3</sup>	NBR 7148
Índice de acidez	1,7	% massa	ASTM D 664
Teor de Glicerol	54,74	% massa	AOCS 14-46
DQO	1.328.040	mg O <sub>2</sub> .L-1	APHA (1998)
Fósforo total	420	mg P.L-	APHA (1998)

AOCS, Métodos oficiais da *American Oil Chemists Society*; EN, *European Standards*; ASTM, *American Society for Testing and Materials*; NBR, Associação Brasileira de Normas Técnicas. FONTE: GIL DE LOS SANTOS, 2012.

#### 4.2.4 Sacarose

A sacarose utilizada foi adquirida no comércio local, na forma de açúcar refinado.

#### 4.2.5 Seleção do meio de cultivo para produção de *Saccharomyces boulardii*

A seleção do meio para o cultivo de *S. boulardii* foi realizada usando cinco meios diferentes ao longo de dois experimentos totalmente independentes. Para

isso, foram utilizados cinco balões aletados de 500 mL, contendo 90 mL das diferentes composições de meios de cultivo: 1) apenas efluente de arroz parboilizado; 2) efluente contendo 1% de sacarose; 3) efluente contendo 3% de sacarose; 4) efluente adicionado de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol de biodiesel e 5) meio padrão para cultivo de leveduras (Yeast Medium, Difco, USA). As concentrações de sacarose e glicerol utilizadas foram definidas em função de resultados obtidos em experimentos anteriores (dados não mostrados).

O pH de cada meio foi ajustado para aproximadamente 5,5 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. Os meios foram autoclavados por 15 min a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ . O pré-inóculo e o inóculo de *S. boulardii* foram produzidos em meio YM (Yeast Medium, Difco, USA), em agitador orbital a 130 rpm e  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , com passagens a cada 24 h. Inicialmente foram inoculadas 5 colônias em 10 mL de meio; após 24 h de incubação os 10 mL foram adicionados a 90 mL de YM. O inóculo foi distribuído nos 5 balões, adicionando 10 mL em cada balão com 90 mL do meio a ser testado. Os cultivos foram realizados em agitador orbital durante 48 h a 130 rpm e  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Durante os experimentos, foram coletadas amostras de 1 mL nos tempos 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 15 h, 24 h e 48 h de cultivo. As amostras foram utilizadas para análise da viabilidade celular ao longo do tempo, através de diluições seriadas e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC.  $\text{mL}^{-1}$ ), em placas de YM sólido.

#### **4.2.6 Determinação de DQO, N-NTK e P- $\text{PO}_4^{3-}$ na seleção de meios**

Amostras dos cultivos foram coletadas em 0 h e 24 h para determinação de DQO, N-NTK e P- $\text{PO}_4^{3-}$ , sendo centrifugadas a 3000 g por 10 min e o sobrenadante utilizado para a determinação do consumo de carbono (Demanda Química de Oxigênio - DQO), nitrogênio (Nitrogênio Total Kjeldahl –NTK) e fósforo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). As amostras foram armazenadas sob refrigeração em  $\text{pH} < 2,0$  usando-se ácido sulfúrico p.a. A DQO foi determinada por refluxo fechado, o fósforo total pelo método do ácido ascórbico e digestão prévia com ácido sulfúrico–ácido nítrico e o nitrogênio por Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK). As análises de cada cultivo foram efetuadas em triplicatas com variação  $< 10\%$ . As metodologias utilizadas como base para as análises estão descritas no Standard Methods (APHA et al., 1998).

#### 4.2.7 Cultivo da levedura em biorreator

Os pré-inóculos e o inóculo de *S. boulardii* foram produzidos em meio YM (Yeast Medium, Difco, USA) num agitador orbital a 150 rpm e 28 °C, com passagens a cada 24 h. Inicialmente foram inoculadas 5 colônias em 10 mL de meio; após 24 h de incubação os 10 mL foram adicionados a 90 mL de YM. Esta suspensão foi fracionada usando-se 20 mL para inocular cada um de quatro balões de 1000 mL contendo 180 mL de YM, e assim obteve-se ao final aproximadamente 800 mL de inóculo para o cultivo em biorreator.

Quatro fermentações independentes foram realizadas, a 250 rpm, 1 vvm de ar e 28 °C por 48 h em um biorreator New Brunswick 110 (New Brunswick Scientific, NJ,USA), contendo 7 L de meio composto por efluente de arroz parboilizado acrescido de 1% de sacarose sendo de 10% em volume de inóculo.

O pH dos cultivos foi ajustado para 5,5 com NaOH 1 M e foi adicionado 2 mL de antiespumante Agripec EA 263 (Agripec Química Farmacêutica S.A.,Brasil) diluído 1: 5 em água. Os meios foram autoclavados na cuba de fermentação por 45 min e a 121 °C.

#### 4.2.8 Quantificação da biomassa, viabilidade celular, determinação de sacarose e análise dos parâmetros ambientais das fermentações em biorreator de bancada

Durante os cultivos, foram coletadas amostras nos tempos 0 h, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 15 h, 24 h, 30 h e 48 h de cultivo, para avaliação da viabilidade celular, densidade celular, determinação de DQO, N-NTK e P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e consumo de sacarose.

A biomassa foi quantificada a partir de três amostras de 10 mL de cada horário, centrifugadas a 3000 g por 15 min e os *pellets* lavados duas vezes e ressuspensos em 10 mL de água destilada. A quantificação de biomassa ocorreu num espectrofotômetro UV-visível (Hitachi, U-1800), por meio da leitura por densidade ótica a 600nm (DO<sub>600</sub>). A absorbância obtida foi convertida em peso de biomassa a partir de uma curva de calibração, segundo metodologia desenvolvida por Gil de los Santos (2012).

A viabilidade celular ao longo dos cultivos foi avaliada a partir de diluições seriadas das amostras e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) em placas de YM sólido.

A determinação de DQO, N-NTK e P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> do sobrenadante dos cultivos em efluente foi realizada como descrito anteriormente (APHA et al., 1998).

O percentual de sacarose consumido foi determinado através do método de DNS (ácido dinitrosalísílico), adaptado para quantificação de açúcares redutores (Reguly, 1996).

#### **4.2.9 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistix versão 9 (Statsoft, USA). Os dados foram analisados por ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas através do teste de Tukey com 5% de nível de significância. O teste de Shapiro- Wilk foi utilizado para avaliação da normalidade.

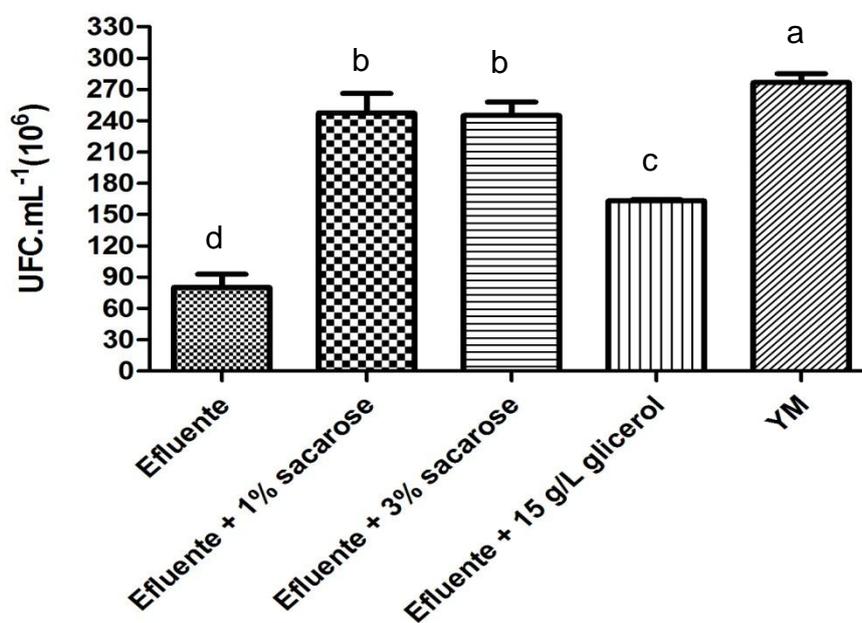
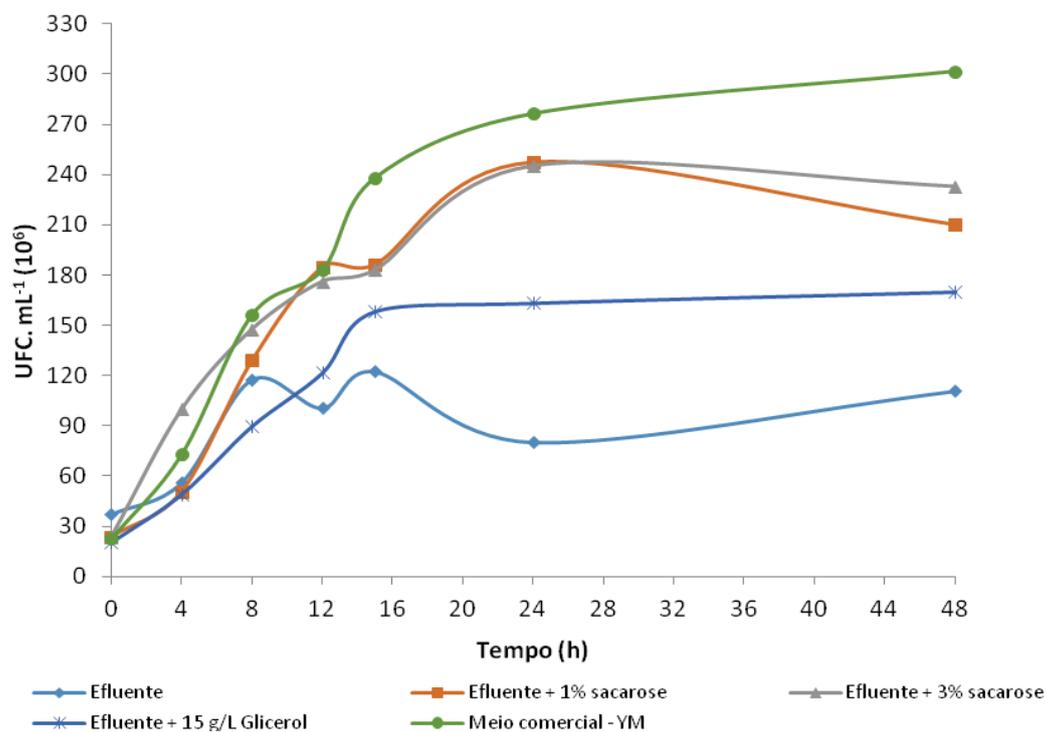
### **4.3 Resultados e Discussão**

#### **4.3.1 Seleção de meios em agitador orbital**

O enriquecimento com fontes extra de carbono permitiram o prolongamento da fase exponencial. A fase estacionária de crescimento celular foi alcançada em 24 h nos cultivos com adição de sacarose e em 15 h nos cultivos com glicerol, sendo em 8 h nos cultivos com efluente puro (Figura 1a).

O cultivo de *S. boulardii* em efluente dos tanques de parboilização de arroz obteve em 24 h melhores resultados de viabilidade celular quando adicionou-se uma fonte extra de carbono (Figura 1b).

(A)



(B)

Figura 1. Viabilidade celular média de dois ensaios em agitador orbital de *Saccharomyces boulardii* cultivada em diferentes composições de meio, durante 48 horas. Figura (a) indica a viabilidade celular ao longo do cultivo e a figura (b) indica viabilidade celular em 24 h de cultivo.

O cultivo de *S. boulardii* em efluente puro obteve o menor desempenho dentre os meios testados, em 24 h de cultivo. Rodrigues e Koetz (1996) já haviam utilizado o efluente dos tanques de maceração de arroz sem adição de fonte extra de carbono como meio de cultivo de *Candida utilis*, que se mostrou pouco adequado para o crescimento da levedura. A adição de uma fonte de carbono a este efluente aumenta a viabilidade celular em cultivos de *Pichia pastoris* (Gil de los Santos et al., 2012) e *Saccharomyces boulardii* (Schneid et al., 2004) no efluente de arroz parboilizado.

Os cultivos em que se adicionou sacarose tiveram viabilidade celular, em 24 h, três vezes maior do que em efluente puro e foram significativamente melhores do que o cultivo suplementado com glicerol de biodiesel neste período (Figura 1b), sugerindo que a sacarose é mais facilmente assimilada pela levedura. A concentração celular inicial inoculada foi de aproximadamente  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> em todos os cultivos, descartando a hipótese de que este fator possa ter influenciado no crescimento celular ao longo do cultivo.

*Saccharomyces boulardii*, até a alguns anos atrás, era considerada uma subespécie de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a sacarose a principal fonte de carbono usada na indústria para os cultivos de *S. cerevisiae* (Badotti et al., 2008). Nos ensaios de seleção de meios a *Saccharomyces boulardii* apresentou um maior desenvolvimento celular quando usamos sacarose como fonte complementar de carbono sugerindo uma melhor adaptação de suas rotas metabólicas à essa fonte. Entre os cultivos com 1% ou 3% de sacarose, não houve diferença significativa na viabilidade celular, sendo preferencial, por questões econômicas, a utilização de 1%, além de reduzir o aumento da DQO do efluente causado pela suplementação.

*Saccharomyces boulardii* tem sido extensivamente utilizada em humanos (Czerucka et al., 2007) e em animais como probiótico. Diversos estudos apontam um efeito positivo de sua utilização em animais como probiótico frente a patógenos e condições de estresse (Gil de los Santos et al., 2005; Gil de los Santos e Gil-Turnes, 2005; Badia et al., 2012). Para que possa exercer ação probiótica, deve-se encontrar em nível populacional adequado, de pelo menos  $10^7$  UFC/grama ou mL (Lee e Salminen, 1995). A viabilidade celular máxima obtida neste estudo, de  $2,4 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em 24 h de cultivo em efluente de arroz parboilizado adicionado com sacarose atende à concentração recomendada para o uso como probiótico,

ressaltando o potencial do uso do efluente de parboilização de arroz como substrato para produção de leveduras para este fim.

O uso de leveduras para biorremediação de efluentes agroindustriais tem sido relatado desde a década de setenta (Yoshizawa, 1978 *apud* Watanabe et al., 2009). Porém, nenhum estudo foi encontrado sobre a utilização de *Saccharomyces boulardii* para redução do impacto ambiental em efluente de arroz parboilizado. O cultivo de *S. boulardii* neste efluente, quando suplementado com sacarose ou glicerol subproduto da indústria de biodiesel, diminuiu as concentrações de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica, sugerindo uma aplicação até então não explorada para a o já consolidado probiótico *Saccharomyces boulardii*: de micro-organismo biorremediador.

Tabela 2. Percentual médio de remoção de fósforo, nitrogênio e DQO de dois experimentos, nos meios de cultivo avaliados após 24 h de cultivo de *S. bouldarii* em agitador orbital.

Tratamento	DQO (mg.L <sup>-1</sup> )			N- NTK (mg.L <sup>-1</sup> )			P (mg.L <sup>-1</sup> )		
	0 h	24 h	Remoção (%) comparada com efluente puro às 24 h	0 h	24 h	Remoção (%) comparada com efluente puro às 24 h	0 h	24 h	Remoção (%) comparada com efluente puro às 24 h
Efluente puro	4.283,1±324,9	4.681,9±928,8	0,0 <sup>c</sup>	208,3 ±14,7	194,9±51,5	0,0 <sup>a</sup>	87,9±1,6	74,7±2,5	0,0 <sup>a</sup>
Efluente + 1% sacarose	13.931,6±1.329,6	6.150,3±2.829,4	-31,4 <sup>c</sup>	189,2±90,8	79,2±21,9	59,3 <sup>b</sup>	58,8±0,5	16,4±14,5	78,1 <sup>b</sup>
Efluente + 3% sacarose	36.635,9±2.494,8	27.861,1±5.426,4	-495,1 <sup>a</sup>	136,3±62,6	66,5±6,4	65,9 <sup>b</sup>	56,7±7,4	13,1±6,2	82,4 <sup>b</sup>
Efluente + 15 g.L <sup>-1</sup> glicerol	20.943,6±2.059,7	18.814,1±4.523,3	-301,8 <sup>b</sup>	162,3±43,0	65,6±25,7	66,3 <sup>b</sup>	77,4±0,7	68,2±2,8	8,7 <sup>a</sup>

A complementação do efluente com fontes de carbono aumenta consideravelmente os níveis de DQO (Tabela 2), quando comparado ao valor médio normalmente encontrado nesse tipo de efluente (Queiroz et al., 1997). No cultivo em efluente suplementado com 1% de sacarose obteve-se a maior eficiência de remoção em relação aos demais cultivos. A adição de sacarose aumentou os níveis de DQO no efluente, que mesmo após o cultivo da levedura por 24 h, ainda apresentava concentração 31,5% maior do que no efluente puro após 24 h de cultivo. Porém, a diferença entre as concentrações de DQO entre estes dois meios em 24 h não foi significativa. A suplementação com 3% de sacarose teve uma eficiência de remoção de DQO aproximadamente 40% inferior quando comparado aos cultivos com 1% de sacarose, em função da maior carga orgânica adicionada (concentração inicial 2,5 vezes maior que no uso de 1% de sacarose) (Figura 2).

Às 24h de cultivo, nos meios com 1% e 3% de sacarose, obteve-se uma remoção de DQO de aproximadamente 56% e 23% respectivamente, sugerindo um excesso de adição de sacarose (Figura 2). Dynesen et al. (1998) citam que a *Saccharomyces cerevisiae* inibe o consumo de sacarose de um meio composto por uma mistura de açúcares fermentáveis quando glicose ou frutose encontram-se em concentrações superiores a 5 g.L<sup>-1</sup>. Desta maneira, no meio composto de efluente com 3% de sacarose, a hidrólise deste dissacarídeo pode ter liberado glicose e frutose a concentrações maiores que 5 g.L<sup>-1</sup>, provocando inibição do consumo de sacarose e também da matéria orgânica proveniente do efluente.

Os níveis de DQO no início e após 24 h de cultivo em efluente suplementado com 15 g. L<sup>-1</sup> de glicerol não apresentaram diferença significativa ( $P < 0.05$ ). Os melhores resultados de remoção (56%) foram obtidos com a adição de 1% de sacarose ao efluente. *Pichia pastoris* aumenta consideravelmente sua biomassa quando há disponibilidade de glicerol como fonte de carbono no meio (Higgings e Cregg, 1998), aumentando conseqüentemente a remoção de matéria orgânica, ao passo que *S. bouldarii* tem preferência por glicose como fonte de carbono, o que explicaria a maior redução de DQO quando há sacarose no efluente.

A eficiência de remoção de DQO obtida neste experimento foi inferior aos 84% alcançados com sistema combinado reator UASB-reator aeróbio (Isoldi et al., 2005) e aos 84% obtidos após 15 h de cultivo da cianobactéria *Aphanotece*

*microscópica Nageli* em biorreator e na ausência de luz, ambos utilizando o mesmo efluente (Queiroz et al., 2007). Entretanto, os 56% de remoção por *S. boulardii* concordam com a eficiência de remoção de 54% de matéria orgânica, pela levedura *Candida utilis*, sendo que este cultivo foi realizado no efluente da parboilização de arroz previamente tratado em reator anaeróbio e enriquecido com “solução nutritiva” composta de diversos sais e biotina (Rodrigues e Koetz, 1996).

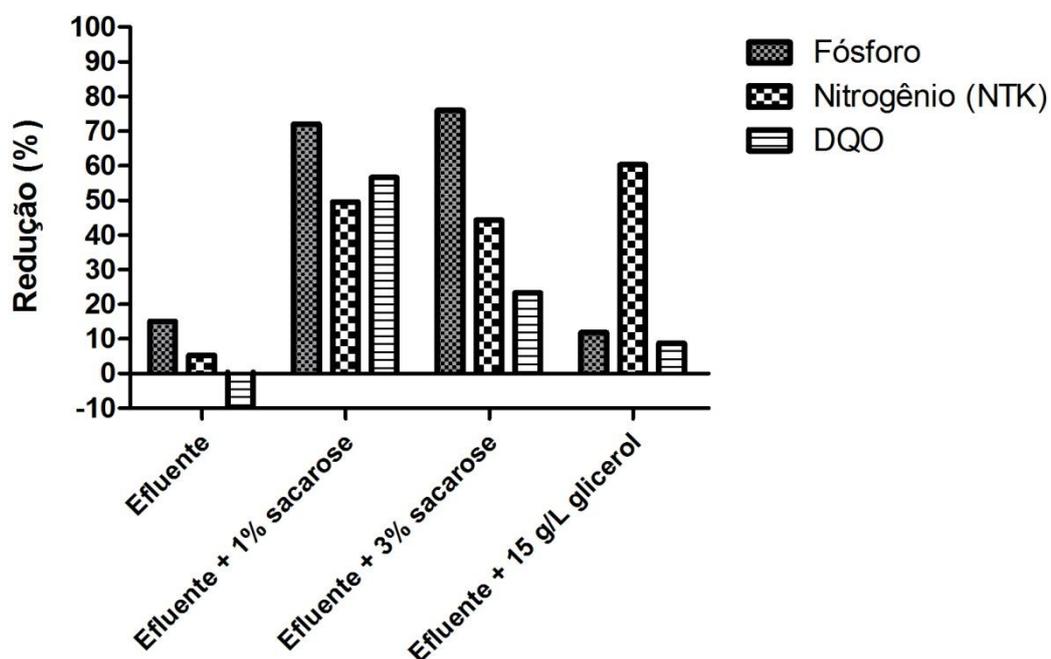


Figura 2. Percentual médio de remoção de fósforo, nitrogênio e DQO de dois experimentos, nos meios de cultivo avaliados após 24 h de cultivo de *S. boulardii* em agitador orbital.

Todos os cultivos suplementados apresentaram uma redução de nitrogênio significativamente maior após 24 h de cultivo frente ao cultivo em efluente puro (Tabela 2). O impacto do cultivo da levedura causou uma remoção de aproximadamente 50% do nitrogênio nos cultivos em efluente com 1% e 3% de sacarose. Embora tenha ocorrido a remoção de 5% do nitrogênio no cultivo em efluente puro, não houve diferença significativa entre a concentração de nitrogênio em 0 h e após 24 h de cultivo. Os altos níveis de absorção de nitrogênio nos cultivos em efluente e sacarose sugerem o aumento do metabolismo e multiplicação celular, o que é confirmado pela maior viabilidade celular nestes cultivos.

A adição de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol de biodiesel ao efluente gerou uma remoção de 60% de nitrogênio após 24 h de cultivo, semelhante aos 65% obtidos no cultivo da levedura *Pichia pastoris* X-33 no mesmo tempo, tipo de efluente e suplementação, em biorreator de bancada (Gil de los Santos, 2012). Estes resultados são interessantes, considerando-se que a utilização do glicerol como fonte de carbono pode ser uma alternativa para o acúmulo deste subproduto industrial, sem custo adicional para a produção da levedura e uma estratégia para a remoção de nitrogênio.

O cultivo de *Candida utilis* em efluente de arroz parboilizado da descarga de um biorreator UASB removeu 68% do nitrogênio total, em 72 h de cultivo em agitador orbital (Rodrigues e Koetz, 1996), semelhante ao obtido pela levedura *S. boulardii* nos três meios testados, em um tempo de cultivo três vezes inferior (24 horas).

A digestão anaeróbia para o tratamento de efluentes ricos em matéria orgânica e nutrientes, como nitrogênio e fósforo, deve ser seguida por um processo de tratamento complementar, visto que embora a matéria orgânica seja reduzida eficientemente, os níveis finais de remoção de nitrogênio e fósforo ainda não são de qualidade (Chernicharo, 1997). No estudo conduzido por Isoldi et al. (2005), os autores utilizaram a estratégia de tratamento do efluente de arroz parboilizado em sistema combinado de reator anaeróbio (UASB) e aeróbio e obteve-se um percentual de 83% de remoção de nitrogênio total. Este resultado é superior ao obtido no cultivo de *S. boulardii*, provavelmente relacionado à junção dos dois processos que permite a oxidação da amônia a nitrato e posteriormente a redução do nitrato a oxigênio molecular, que é liberado na atmosfera. Além disso, as condições de cultivo em biorreatores são melhores e mais facilmente controladas do que em balões, utilizados para o cultivo de *S. boulardii*. Dessa forma, um tratamento complementar aos cultivos com leveduras pode ser aplicado para atingir os índices exigidos pela FEPAM, órgão estadual de monitoramento ambiental, que fiscaliza a indústria da qual se obteve o efluente.

No presente estudo, as maiores médias de remoção foram para o fósforo. Os cultivos efetuados em efluente suplementado com 1% e 3% de sacarose em 24 h alcançaram 72% e 76% de remoção, respectivamente, valores próximos aos 75% de

remoção exigida pelo órgão ambiental (FEPAM). A concentração de fósforo após 24 h de cultivo nestes meios foi significativamente menor do que no efluente puro e no efluente contendo 15 g. L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel.

Resultados semelhantes aos alcançados com suplementação com sacarose já haviam sido encontrados no cultivo de *Pichia pastoris* X-33 no mesmo tipo de efluente com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel: 52% de remoção de fósforo após 70 h de cultivo em agitador orbital (Gil de los Santos et al., 2012) e de 90% após 48 h de cultivo em biorreator (Gil de los Santos, 2012). Estes dados demonstram o potencial das leveduras como sistema de tratamento de efluente dos tanques de parboilização de arroz.

Os altos níveis de absorção de fósforo quando se adicionou 1% e 3% de sacarose sugerem que este nutriente foi assimilado para atender às exigências nutricionais para a multiplicação celular e produção de biomassa, visto que a maior viabilidade celular também foi observada no efluente enriquecido com sacarose. As altas taxas de consumo de fósforo também podem estar relacionadas à fosforilação que ocorre na glicose e frutose após sua entrada na célula pelas hexoquinases PI ou PII para continuidade do metabolismo (Dynesen et al., 1998).

Sistemas de tratamento de efluentes que utilizam plantas aquáticas emergentes (PAE) ou *wetlands* possuem potencial de aplicação em indústrias, domicílios e na produção agrícola, como pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios ou como etapa única de tratamento secundário (Schulz, 2009). A implementação deste sistema em uma indústria de arroz parboilizado de Pelotas, o qual era formado por um reator anaeróbio UASB e um conjunto de 14 lagoas com plantas aquáticas emergentes, gerou eficiência de remoção de 68% da DQO, 52% do nitrogênio total e 73% do fósforo total (Gerber, 2002). Os resultados obtidos com este sistema combinado ressaltam o potencial de *S. bouldarii* como agente biorremediador de efluente de arroz parboilizado, considerando que seu cultivo em balões alcança eficiência de remoção semelhante à obtida pelo complexo UASB-PAE.

O cultivo de *S. bouldarii* em efluente com 1% de sacarose também se mostrou superior, quanto à redução de parâmetros ambientais, quando comparado ao tratamento do mesmo efluente, em reator em batelada sequencial. Neste

experimento, realizaram-se ciclos anaeróbicos e aeróbicos, com o maior nível de remoção obtido de 17.8%, situação na qual os autores concluíram ser necessário um processo de precipitação química para complementar a remoção de fósforo a níveis exigidos pelos órgãos fiscalizadores (Faria et al., 2006).

#### **4.3.2 Cultivos em Biorreator**

Nos ensaios em agitador orbital foram testados diferentes meios para o cultivo de *Saccharomyces boulardii*, compostos de efluente de arroz parboilizado e uma fonte de carbono: sacarose ou glicerol residual da indústria de biodiesel. O efluente suplementado com 1% de sacarose permitiu os melhores resultados de viabilidade celular e os melhores índices de remoção de DQO, nitrogênio e fósforo e foi o meio escolhido para realizar cultivos em biorreator de bancada.

O crescimento de *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado suplementado com 1% de sacarose e a eficiência de remoção de DQO e fósforo foram avaliados, em quatro cultivos independentes em biorreator de bancada. A média dos valores de viabilidade celular obtidos nos quatro ensaios em biorreator está na Figura 3.

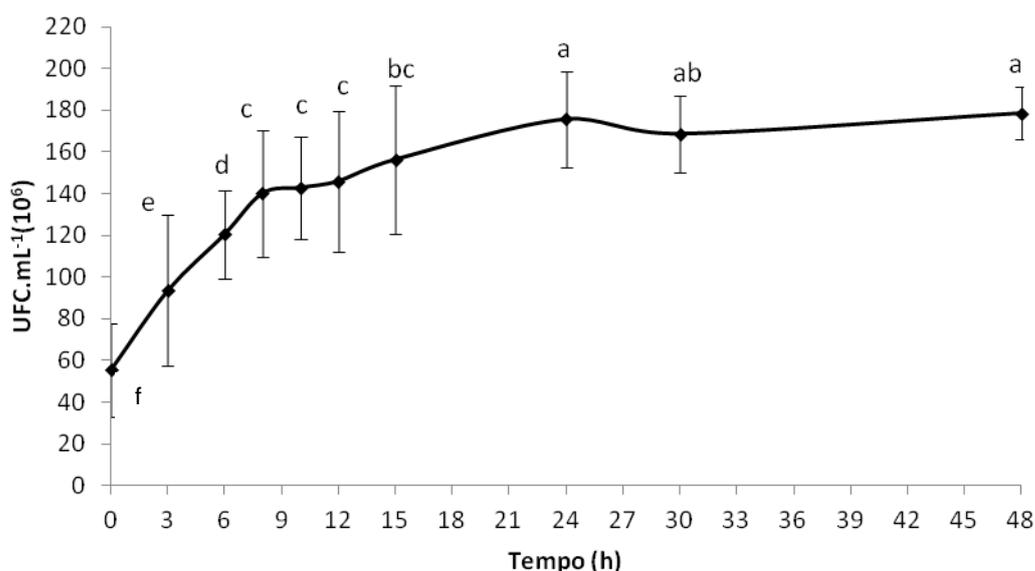


Figura 3. Viabilidade celular média (UFC. mL<sup>-1</sup> x10<sup>6</sup>) de quatro cultivos de *S. boulardii* em biorreator, utilizando efluente do processo de parboilização de arroz + 1% de sacarose como meio.

A fase estacionária do crescimento celular iniciou após 10 h de cultivo, permitindo a obtenção de uma viabilidade máxima de  $1,8 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> após 24 h de cultivo. Tais viabilidades, obtidas em biorreator, se aproximaram dos  $2,7 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup> obtidos em meio comercial em 24 h (Figura 1a).

As coletas de efluente de arroz parboilizado para os ensaios em balões e para os cultivos em biorreator foram realizadas em diferentes épocas do ano. Segundo Queiroz e Koetz (1997), a variabilidade dos diferentes componentes deste efluente podem ser atribuídas às diferenças da matéria prima, como também as variações nas etapas do processamento e épocas do ano. Portanto, os menores valores de viabilidade celular também podem estar relacionados a diferenças na composição do efluente em função da coleta em tempos diferentes.

Na figura 4 nota-se que às 24 h de cultivo a levedura atingiu uma média de biomassa, entre os quatro cultivos, de 3,0 g por litro, aproximadamente 4,5 vezes superior à biomassa inicial. A curva de biomassa mostrou uma inflexão a partir de 8 h, que coincide com o início da fase de adaptação da levedura, após o esgotamento de sacarose (Figura 5). Estes resultados mostram uma semelhança de comportamento entre viabilidade celular e biomassa, mostrando que ao chegar à fase estacionária, a multiplicação celular diminui e o número de células viáveis é

constante e, conseqüentemente, a biomassa produzida é menor que no início do cultivo.

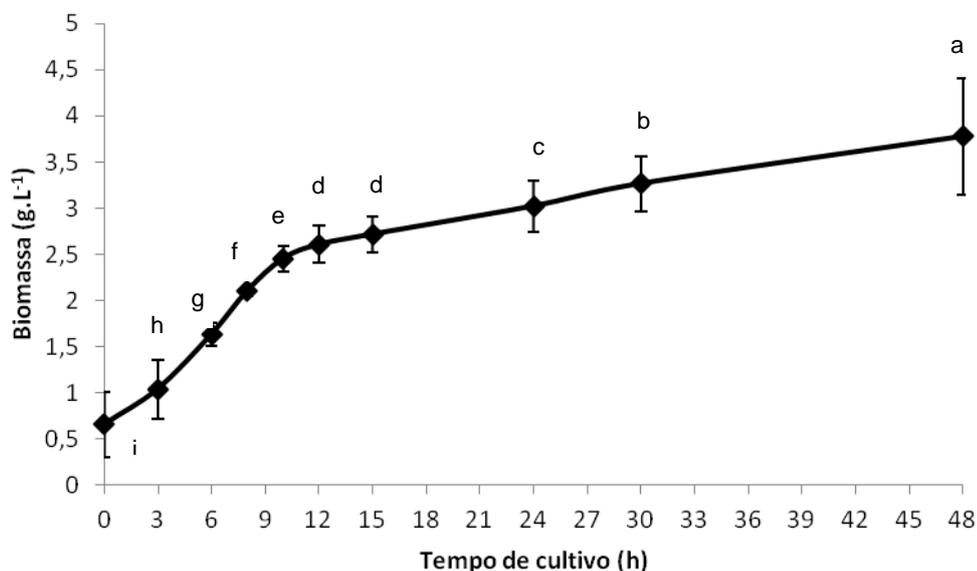


Figura 4. Valor médio de biomassa seca obtida em quatro cultivos de *S. boulardii* em biorreator, utilizando efluente do processo de parboilização de arroz + 1% de sacarose como meio.

Resultados semelhantes foram observados em outro estudo, com a levedura oleaginosa *Rhodosporidium toruloides*, que produziu 5,03 g.L<sup>-1</sup> de biomassa quando cultivada em efluente de destilaria, com 10% de inóculo e 16.527 mg.L<sup>-1</sup> de DQO inicial (Ling et al., 2013). A concentração do inóculo e a carga orgânica do efluente usado para o crescimento de *R. toruloides* são semelhantes aos usados nestes quatro cultivos em biorreator, com efluente de arroz parboilizado suplementado com 1% de sacarose, no qual foi obtido 3,8 g.L<sup>-1</sup> de *S. boulardii*. Estes dados permitem sugerir que a concentração de matéria orgânica e a densidade celular inicial em um cultivo podem influenciar na produção de biomassa.

O cultivo de *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado enriquecido com sacarose 1% gerou biomassa de 3,8 g.L<sup>-1</sup>, oito vezes superior à biomassa de 0,47 g.L<sup>-1</sup>, da alga *Aphanotece microscópica Nägeli*, cultivada no mesmo tipo de efluente (Zepka et al., 2008).

O trabalho de Muller et al. (2007) também com *Saccharomyces boulardii* demonstrou resultados que concordam com os deste estudo. Muller et al. (2007) obtiveram o valor de 3,1 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 12 h em biorreator *air lift* 1,0 vvm, enquanto que no cultivo em efluente alcançamos o valor de 2,6 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de

*S. boulardii* neste mesmo tempo de cultivo. Considerando o baixo custo da preparação do efluente + 1% de sacarose para o cultivo da levedura, obteve-se certa vantagem, já que o meio utilizado por Muller et al. (2007) para cultivar a levedura foi um meio comercial, de custo elevado, composto por glicose anidra, peptona de carne, extrato de levedura, uréia e sulfato de magnésio.

A produção de biomassa de uma cepa mutante de *Candida utilis* UNA1 para uso como extrato de levedura e proteína celular foi realizada por Watanabe et al. (2013) através do tratamento de efluente de *shochu*, uma bebida japonesa obtida pela fermentação de batata-doce ou cevada, que obteve ao final do tratamento de 1.000 L de efluente, por cultivos sequenciais em batelada alimentada, 16,7 kg de biomassa seca. Com o tratamento do mesmo volume de efluente de arroz parboilizado pelo cultivo de *S. boulardii*, seria produzido 3,8 kg de biomassa seca, 4,4 vezes inferior que o obtido por Watanabe et al. (2013) no efluente de *shochu*. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de serem espécies diferentes, com características de crescimento distintas, assim como à diferença na variabilidade e concentração de matéria orgânica e nutrientes presentes nos dois meios comparados.

Aproximadamente 90% da sacarose adicionada no efluente de arroz parboilizado para o cultivo de *S. boulardii* foi consumida nas 6 primeiras horas (Figura 5). Relacionando este padrão de consumo ao de viabilidade celular, observa-se que até 10 horas o cultivo está em crescimento logarítmico, entrando posteriormente em uma fase onde a viabilidade celular permanece constante até as 15 h. Observando este comportamento, conclui-se que a levedura consumiu preferencialmente a sacarose adicionada, em detrimento da matéria orgânica presente no efluente.

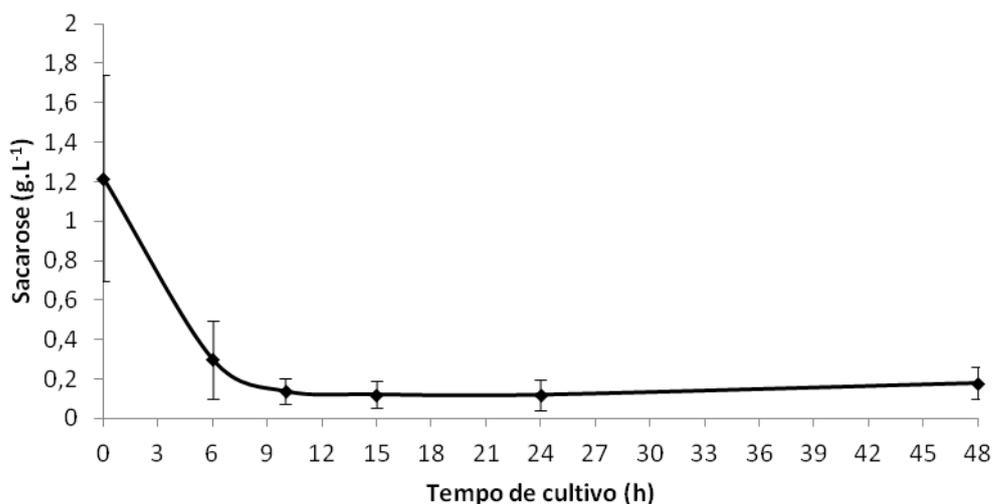


Figura 5. Concentração média de sacarose no efluente de arroz parboilizado ao longo do cultivo de *Saccharomyces boulardii* em biorreator.

Muller et al. (2007) tiveram resultados que coincidem com as informações obtidas e relatadas acima. Em processos fermentativos também realizados com *Saccharomyces boulardii*, os autores utilizaram um meio composto por peptona de carne, extrato de levedura, uréia, magnésio, enxofre, fosfatos e 1% de glicose para o cultivo da levedura em fermentador tipo *air lift* 1 vvm. Nestes cultivos, a glicose foi esgotada em 6 h de cultivo, corroborando com os resultados obtidos no cultivo em efluente de arroz parboilizado + 1% de sacarose, no qual mais de 90% deste açúcar foi consumido em 6 h. Em concordância, a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* cultivada em meio YPSuc (1% extrato de levedura; 2% peptona e 2% de sacarose) teve a taxa máxima de consumo de açúcar em 6 h ( $2.5 \text{ g. L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Neste período, 90% da sacarose presente no meio havia sido consumida e em 12 h de cultivo toda a sacarose havia sido esgotada (Lertwattanasakul et al., 2011).

Os percentuais médios de remoção dos parâmetros ambientais avaliados nos quatro ensaios em biorreator encontram-se na Figura 6.

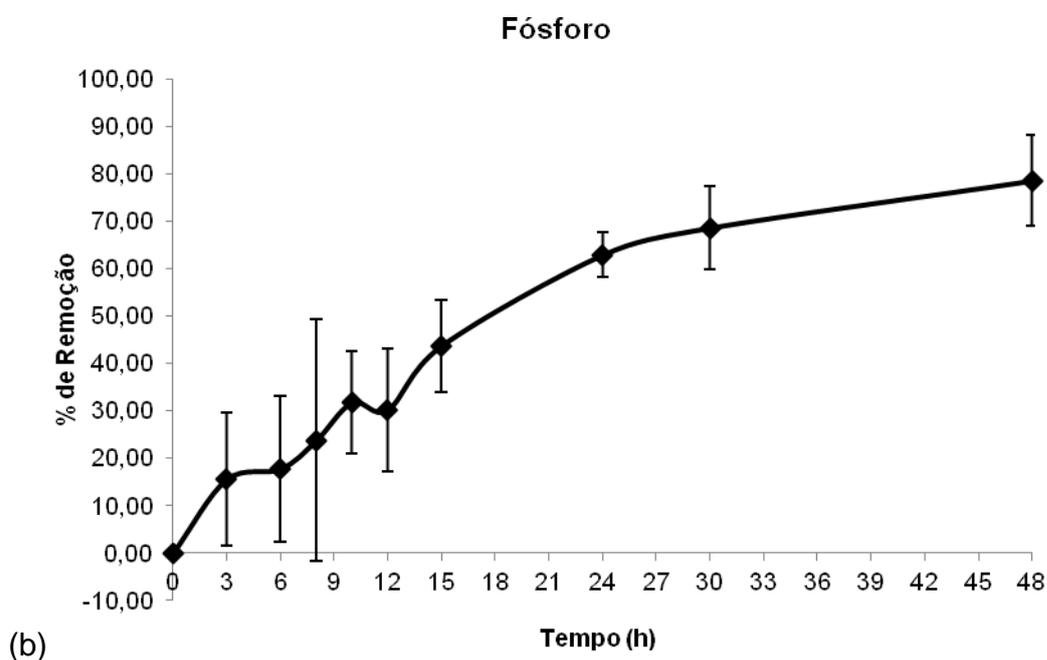
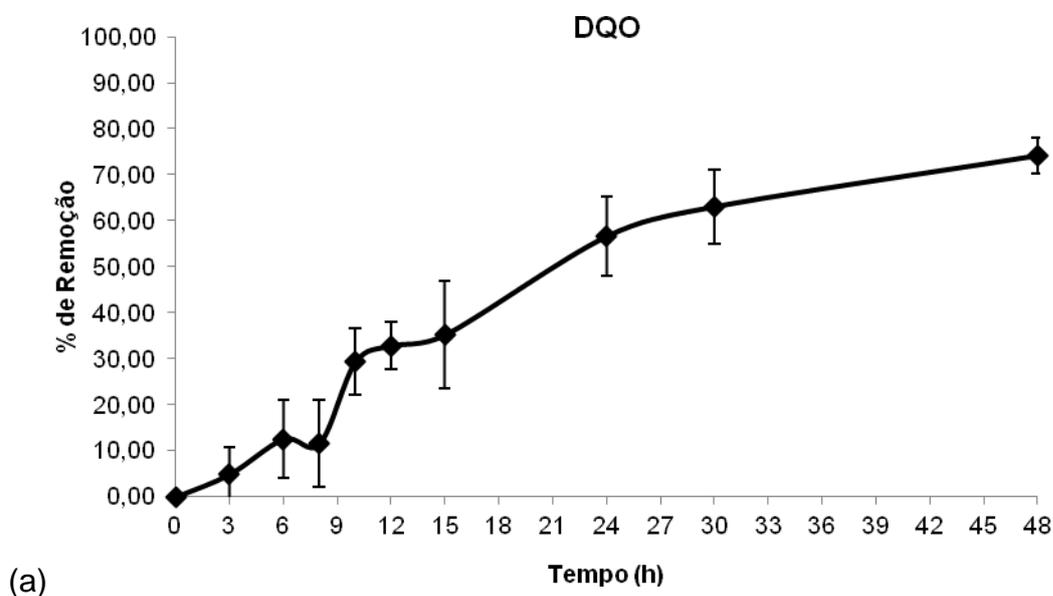


Figura 6. Eficiência de remoção média de DQO (a) e Fósforo (b) de quatro cultivos de *Saccharomyces boulardii* em biorreator, utilizando efluente do processo de parboilização de arroz + 1% de sacarose como meio.

Nos experimentos em biorreator não foi realizada a quantificação de nitrogênio, apesar dos resultados positivos alcançados nos ensaios em balão, devido a dificuldades encontradas com a metodologia utilizada.

Após 24 h de cultivo, detectou-se a remoção média de 63% do fósforo do efluente, reforçando resultados já alcançados em ensaios anteriores em agitador orbital com o mesmo meio, situação na qual se obteve 72% de remoção no mesmo horário. A maior eficiência de remoção, de 78%, ocorreu em 48 h, suprimindo as exigências de 75% de remoção impostas à indústria de beneficiamento de arroz pelo órgão de monitoramento ambiental estadual (FEPAM).

Tabela 3. Valores médios de concentração de fósforo e DQO ao longo de 48 h de cultivo de *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado +1% de sacarose em biorreator.

Tempo de cultivo (h)	DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	P (mg.L <sup>-1</sup> )
0	15.639,6 ± 1.472,2 <sup>a</sup>	41,8 ± 13,2 <sup>a</sup>
3	14.839,3 ± 1.476,1 <sup>a</sup>	33,0 ± 3,8 <sup>b</sup>
6	13.641,5 ± 1.784,3 <sup>b</sup>	31,4 ± 6,6 <sup>b</sup>
8	12.730,9 ± 1.022,5 <sup>b</sup>	28,4 ± 5,1 <sup>bc</sup>
10	11.059,6 ± 1.768,9 <sup>c</sup>	27,0 ± 5,0 <sup>c</sup>
12	10.524,3 ± 1.627,3 <sup>c</sup>	27,7 ± 5,0 <sup>c</sup>
15	10.217,1 ± 2.746,4 <sup>c</sup>	23,6 ± 6,2 <sup>c</sup>
24	6.761,0 ± 1.613,1 <sup>d</sup>	15,4 ± 4,8 <sup>d</sup>
30	5.820,3 ± 1.782,0 <sup>d</sup>	13,1 ± 4,4 <sup>de</sup>
48	4.041,8 ± 814,1 <sup>e</sup>	10,4 ± 4,5 <sup>e</sup>
<b>Efluente Bruto (sem sacarose)</b>	<b>5.575,8 ± 419,9</b>	<b>62,4 ± 12,9</b>

Os maiores valores de remoção de DQO observados foram de 74% ao final do cultivo (48 h). Em 24 h, a taxa de remoção era de 56%, mesmo percentual observado em ensaios em agitador orbital com a mesma levedura e tipo de efluente. A eficiência de remoção de DQO no mesmo efluente por *Pichia pastoris* foi de 20% (Gil de los Santos, 2012), aproximadamente 2,8 vezes inferior que o resultado em 24 h e 2 vezes inferior em 48 h (39%) . Além disso, apenas após 96 h de cultivo *P. pastoris* foi capaz de assimilar 63% da matéria orgânica em forma de DQO. Sugere-se a partir destas observações, que *Saccharomyces boulardii* possui um metabolismo mais adaptado à absorção das formas de matéria orgânica presentes no efluente de arroz parboilizado.

Um pico de remoção de DQO foi registrado entre 8 e 12 h, de 12% para 33%, que coincide com a fase de esgotamento da sacarose adicionada ao efluente,

indicando que após a exaustão da fonte preferencial de carbono, a levedura passou a assimilar com maior intensidade a matéria orgânica oriunda do efluente.

Em 24 h obteve-se uma DQO média de 6761 mg de O<sub>2</sub>. L<sup>-1</sup>, valor semelhante ao encontrado normalmente nos efluentes das indústrias de parboilização antes dos processos de tratamentos de efluentes. Logo, em 24 h mesmo com o aumento dos níveis de DQO devido à adição de sacarose, é possível produzir 4 g.L<sup>-1</sup> de biomassa e remover 63 % de fósforo, sendo este último um dos parâmetros mais difíceis de serem tratados pelos sistemas normalmente usados nesse tipo de indústria.

Os resultados obtidos demonstram o potencial do uso de leveduras para biorremediar efluentes como o dos tanques de parboilização de arroz, gerando-se ao mesmo tempo biomassa celular que pode vir a ser usada como probiótico na alimentação animal.

Análises complementares de demanda biológica de oxigênio (DBO), ensaios de toxicidade e avaliação do perfil de aminoácidos da biomassa estão em andamento, com a finalidade de corroborar com os resultados já obtidos e aqui descritos e também para agregar informações sobre esta nova tecnologia de produção de probiótico e biorremediação que vem sendo desenvolvida.

#### **4.4 Conclusões**

A levedura *Saccharomyces boulardii* pode ser utilizada como agente biorremediador para o tratamento de efluentes dos tanques de parboilização de arroz. A adição de 1% de sacarose ao efluente de arroz parboilizado proporcionou ao cultivo o melhor desempenho na viabilidade celular e redução de 49% do nitrogênio total Kjeldahl, 72% do fósforo e 56% da DQO. Nos ensaios em biorreator, foi produzido em média 3,8 g. L<sup>-1</sup> de biomassa de *S. boulardii* e 1,8 x 10<sup>11</sup> UFC. L<sup>-1</sup> em 48 h de cultivo em efluente +1% de sacarose. Além disso, as taxas de remoção de DQO e fósforo foram de 74% e 78%, respectivamente. Portanto, mostra-se viável a utilização de *Saccharomyces boulardii* para a simultânea remoção de DQO e fósforo deste tipo de efluente e produção de probiótico a partir de substratos de baixo custo para utilização na produção animal.

#### 4.5 Referências Bibliográficas

ABIAP - Associação Brasileira das Indústrias de Arroz Parboilizado, 2009. Informativos. Disponível em: <http://www.abiap.com.br/site-pt/content/informativos/> [Acesso em: 02 de novembro de 2014].

APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC, USA, 20th edition.

Badia, R., Brufau, M.T., Guerrero-Zamora, A.M., Lizardo, R., Dobrescu, I., Martin-Venegas, R., Brufau, J., 2012.  $\beta$ -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19 (3), 368–76.

Badotti, F., Dário, M. G., Alves, S. L., Cordioli, M. L., Miletti, L. C., Araujo, P. S., Stambuk, B.U., 2008. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 7 (4), 1-11.

Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bello, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, M., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S., 2011. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*. 36, 1097-1108.

Chernicharo, C. A., 1997. Reatores Anaeróbios. In: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais. 246 p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. Acompanhamento da safra nacional de grãos – Safra 2013/14. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&> [Acesso em: 02 de novembro de 2014].

CONSEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente, 2006. Resolução CONSEMA Nº 128/2006. Disponível em: [https://www.univates.br/unianalises/media/imagens/Anexo\\_IV\\_61957\\_3.pdf](https://www.univates.br/unianalises/media/imagens/Anexo_IV_61957_3.pdf) Acesso em: 05 de novembro de 2014].

Copolla, M.M., Conceição, F.R., Gil-Turnes, C., 2005. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food and Agricultural Immunology*. 16, 213-219.

Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P., 2007. Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 26 (6), 767–78.

Dynesen, J., Smits, H. P., Olsson, L., Nielsen, J., 1998. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50 (5), 579–582.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. Our food and agriculture in numbers. Disponível em: <http://www.fao.org/assets/infographics/FAO-Infographic-food-ag-en.pdf>. [Acesso em: 09 de novembro de 2014].

Faria, O.L.V., Koetz, P.R., Santos, M.S., Nunes, W.A., 2006. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26 (2), 309-317.

Gerber, M., 2002. Tratabilidade de efluentes da parboilização de arroz em sistema com plantas aquáticas emergentes. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

Gil de los Santos, D., 2012. Cultivo de *Pichia pastoris* X33 em efluentes industriais e suas aplicações. Tese (Doutorado em Ciências). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

Gil de los Santos, D., Gil-Turnes, C., Conceição, F.R., 2012. Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel-derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. *Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/492925

Gil de los Santos, J.R., Gil-Turnes, C., 2005. Probióticos em avicultura. *Ciência Rural*. 35 (3), 741-747.

Gil de los Santos, J.R., Storch, O.B., Gil-Turnes, C., 2005. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *British Poultry Science*. 46, 494-497.

Higgings, D.R., Cregg, M., 1998. *Methods in Molecular Biology – Pichia Protocols*. Humana Press, USA.

Isoldi, L.A., Koetz, P.R., Isoldi, L.A., 2005. Post-treatment a nitrified parboiled rice wastewater using denitrification in UASB reactor. *Engenharia Sanitária Ambiental*. 10 (4), 271-277.

Lee, Y., Salminen, S., 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 6, 241-245.

Lertwattanasakul, N., Rodrussamee, N., Suprayogi, Limtong, S., Thanonkeo, P., Kosaka, P., Yamada, M., 2011. Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. *AMB Express*. 1 (20), 11 p.

Ling, J., Nip, S., Shim, H., 2013. Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. *Bioresource technology*. 146, 301–9.

Muller, J.L., Protti, K.L., Machado, M.S., Lacerda, L.L.V., Bresolin, T.M.B., Podlech, P.S., 2007. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27 (4), 688-693.

Queiroz, M., Koetz, P.R., 1997. Caracterização do efluente da parboilização do arroz. *Revista Brasileira de Agrociência*. 3, 139-143.

Queiroz, M.I., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q., Bastos, R.G, Goldbeck, R., 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*. 98, 2163–2169.

Rajput, I. R., Hussain, A., Li, Y. L., Zhang, X., Xu, X., Long, M. Y., Li, W. F., 2014. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 modulate TLRs mediated signaling to induce immunity by chicken BMDCs. *Journal of Cellular Biochemistry*. 115 (1), 189–98.

Reguly, J. C., 1996. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 330 p.

Riaño, B., Hernández, D., García-González, M. C., 2012. Microalgal-based systems for wastewater treatment: Effect of applied organic and nutrient loading rate on biomass composition. *Ecological Engineering*. 49, 112–117.

Rodrigues, R., Koetz, P.R., 1996. Remoção de nitrogênio de efluente da indústria de arroz parboilizado por incorporação em biomassa celular de *Candida utilis*-IZ-1840. *Revista Brasileira de Agrociência*. 2 (3), 141–146.

Schneid, A.S., Gil de los Santos, J.R., Elías Jr., M., Gil-Turnes, C., 2004. Wastewater of rice parboiling process as substrate for probiotics. In: 2nd International Probiotic Conference, Kosice, Slovakia, p. 66.

Schulz, G., 2009. Sistema de tratamento de efluentes com plantas aquáticas emergentes (PAE) para o processo de parboilização de arroz. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia). Canoas: Universidade Luterana do Brasil.

Von Sperling, M., Oliveira, S.C., 2009. Comparative performance evaluation of full-scale anaerobic and aerobic wastewater treatment processes in Brazil. *Water Science and Technology*. 59 (1), 15–22.

Watanabe, T., Iefuji, H., Kitamoto, H.K., 2013. Treatment of, and *Candida utilis* biomass production from shochu wastewater ; the effects of maintaining a low pH on DOC removal and feeding cultivation on biomass production. *Springer Plus*. 514 (2), 1–7.

Watanabe, T., Masaki, K., Iwashita, K., Fujii, T., Iefuji, H., 2009. Treatment and phosphorus removal from high-concentration organic wastewater by the yeast *Hansenula anomala* J224 PAWA. *Bioresource Technology*. 100, 1781–1785.

Wei, D., Shi, L., Yan, T., Zhang, G., Wang, Y., Du, B., 2014. Aerobic granules formation and simultaneous nitrogen and phosphorus removal treating high strength ammonia wastewater in sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*. 171, 211–6.

Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Queiroz, M.I., 2008. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica nageli* submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*. 47, 1305–1310.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

O efluente da indústria de arroz parboilizado suplementado com 1% de sacarose pode ser utilizado para a produção de *Saccharomyces boulardii*, permitindo a obtenção de uma viabilidade máxima de  $1,8 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> após 24 h de cultivo e 3,8 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 48 horas.

A levedura *Saccharomyces boulardii* pode ser utilizada como agente biorremediador do efluente dos tanques de parboilização de arroz, visto que após 24 h de cultivo, houve redução de aproximadamente 63 % de fósforo e 54% de DQO do efluente utilizado no cultivo da levedura e em 48 h após o cultivo, estes percentuais aumentaram para 78% e 74%, respectivamente.

Os resultados de remoção de nitrogênio indicam que o meio mais apropriado para o tratamento deste nutriente é o efluente suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol subproduto da indústria de biodiesel, que promoveu a remoção de 60% de nitrogênio. O uso de glicerol de biodiesel como fonte de carbono é uma alternativa interessante e que merece investigações futuras, visto que ainda não há uma aplicação consolidada para este resíduo. Nos cultivos em biorreator, em efluente + 1% de sacarose, os resultados de remoção de nitrogênio não foram conclusivos pela quantificação de Nitrogênio Total Kjeldahl–NTK, sendo necessário testar futuramente outras metodologias que permitam a análise correta deste parâmetro.

Ressalta-se a importância destes resultados, visto que os experimentos foram realizados com efluente de arroz parboilizado real, coletado de uma indústria responsável pelo beneficiamento deste grão em larga escala. O alto percentual de remoção de parâmetros ambientais encoraja a continuidade dos estudos, com foco no desenvolvimento de uma nova metodologia de biorremediação através da produção de probióticos em efluente oriundo dos tanques de parboilização de arroz.

## 6 REFERÊNCIAS

ABIAP (2009). *Informativos*. [Online] Disponível em: <http://www.abiap.com.br/site-pt/content/informativos/> [Acesso em: 02 de novembro de 2014].

AGARWAL, N., KAMRA, D.N., CHAUDHARY, L.C., AGARWAL, L., SAHOO, A., PATHAK, N.N. (2002). Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves on different microbial feed additives. *Letters in Applied Microbiology*. 34. p. 329-336.

ANCHENG, L., ZHU, J., NDEGWA, P.M. (2002). Influence of Anaerobic Pre-conditioning on Phosphorus Removal in Swine Manure by Aeration. *Water, Air and Soil Pollution*. 140 (1). p. 219-230.

BADIA, R., BRUFAU, M.T., GUERRERO-ZAMORA, A.M., LIZARDO, R., DOBRESCU, I., MARTIN-VENEGAS, R., FERRER, R., SALMON, H., MARTÍNEZ, P., BRUFAU, J. (2012).  $\beta$ -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clinical and vaccine immunology*. 19(3). p. 368–76.

BARFORD, J.P., JOHNSTON, J.H. & MWESIGYE, P.K.K. (1995). Continuous Culture Study of Transient Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Sucrose and Fructose. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79 (2). p.158-162.

BEZERRA, S.M.C. (1998). *Influência do tempo de detenção hidráulica sobre a auto-inoculação na partida de um reator UASB tratando esgoto sanitário*. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, área de Saneamento. Campina Grande, Universidade Federal da Paraíba.

CHALÓN, M.C., TERÁN, V., ARENA, M.E., OLISZEWKI, R. & GONZÁLEZ, S.N. (2013). Microbiological culture broth designed from food waste. *Journal of environmental management*. 115. p. 1–4.

CHATZIFRAGKOU, A., MAKRI, A., BELKA, A., BELLO, S., MAVROU, M., MASTORIDOU, M., MYSTRIOTI, M., ONJARO, G., AGGELIS, G., PAPANIKOLAOU, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*. 36. p. 1097-1108.

CHOI, M.H. & PARK, Y.H. (2003). Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. *Biomass and Bioenergy*. 25 (2). p. 221–226.

CONAB (2014). *Acompanhamento da safra nacional de grãos – Safra 2013/14*. [Online] Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&> [Acesso em: 02 de novembro de 2014].

COPOLLA, M.M., CONCEIÇÃO, F.R. & GIL-TURNES, C. (2005) Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food and Agric Immunol.* 16. p. 213-219.

CZERUCKA, D., RAMPAL, P. (2002). Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection.* 4. p. 733–739.

DESNOYERS, M., GIGER-REVERDIN, S., BERTIN, G., DUVAUX-PONTER, C., SAUVANT, D. (2009). Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *Journal of Dairy Science.* 92. p. 1620-1632.

DIXON, N.G.H., GAMBRILL, M.P., CATUNDA, P.F.C. & VANHAANDEL, A. C. (1995). Removal of pathogenic organisms from the effluent of an upflow anaerobic digester using waste stabilization ponds. *Water Science and Technology.* 31(12). p. 275–284.

EDUARDES-INGRAM, L., GITSHAM, P., BURTON, N., WARHURST, G., CLARKE, I., HOYLE, D., OLIVER, S.G., STATEVA, L. (2007). Genotypic and Physiological Characterization of *Saccharomyces boulardii*, the Probiotic Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology.* 73 (8). p. 2458–2467.

ELIAS, M.C., ROMBALDI, C.V., DIAS, A.R.G., NORA, L., SILVA, J.A. (1998). *Industrialização do arroz*. Resumo para aulas práticas e/ou treinamentos. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2005). *Arroz*. [Online] Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>. [Acesso em: 09 de novembro de 2014].

FAO/WHO. (2002). *Food and Agriculture Organization Guidelines for evaluation of probiotics in food*. [Online] Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. [Acesso em: 19 de outubro de 2014].

FARIA, L.O.V., KOETZ, P.R., SANTOS, M.S. & NUNES, W.A. (2006). Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial ( RBS ). *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 26 (2). p. 309-317.

FARIA, O.L.V. (2006). *Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS) associada à precipitação química*. Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

FARIA, O.L.V., NUNES, W.A., KOETZ, P.R. (2005). Tratamento de Efluentes da Indústria da Parboilização de Arroz. In: II *Simpósio Sul-brasileiro de Qualidade de Arroz*. Pelotas. p. 319-330.

FRASSON, A.C. (2011). *Escolha de alternativa tecnológica para tratamento e destino final de lodo gerado no tratamento de efluentes líquidos de agroindústrias com base no método AHP*. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento. Londrina: Universidade Estadual de Londrina.

GAGGIÀ, F., MATTARELLI, P. & BIAVATI, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. 141. p. S15–S28.

GÉLINAS, P. & BARRETTE, J. (2007). Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology*. 98 (5). p. 1138–43.

GERBER, M. (2002). *Tratabilidade de efluentes da parboilização de arroz em sistema com plantas aquáticas emergentes*. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

GIL DE LOS SANTOS, D. (2012). *Cultivo de Pichia pastoris X33 em efluentes industriais e suas aplicações*. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia ambiental). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

GIL DE LOS SANTOS, D., GIL-TURNES, C., CONCEIÇÃO, F.R. (2012a). Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel-derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/492925

GIL DE LOS SANTOS, J.R., STORCH, O.B. & GIL-TURNES, C. (2005). *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *British Poultry Science*. 46. p. 494-497.

GIL DE LOS SANTOS, J.R., STORCH, O.B., FERNANDES, C.G. & GIL-TURNES, C. (2012b). Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. *Veterinary Microbiology*. 156. p. 448-451.

GIORDANO, G. (2003). *Análise e formulação de processos para tratamento dos chorumes gerados em aterros de resíduos sólidos urbanos*. Tese de Doutorado apresentada à Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

GONZALEZ-GARCIA, Y., HERNANDEZ, R., ZHANG, G., ESCALANTE, F.M.E., HOLMES, W. & FRENCH, W.T. (2011). Lipids accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus curvatus* growing on distillery wastewater as culture medium. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 32 (1). p. 69-74.

HEINEMANN, R.J.B., FAGUNDES, P.L., PINTO, E. A., PENTEADO, M.V.C. & LANFER-MARQUEZ, U.M. (2005). Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18(4). p. 287–296.

HUANG, L., ZHANG, B., GAO, B. & SUN, G. (2014). Application of fishmeal wastewater as a potential low-cost medium for lipid production by *Lipomyces starkeyi* HL. *Environmental Technology*. 32 (16). p. 1975–1981.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2014). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – setembro 2014*. [Online] Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201409.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201409.pdf). [Acesso em: 04 de novembro de 2014].

JOUANY, J.P. (2006). Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science*. 96. p. 250–264.

KATO, M. & IEFUJI, H. (2011). Breeding of a new wastewater treatment yeast by genetic engineering. *AMB Express*. [Online] 7 (2). p. 1-6. Disponível em: <http://www.amb-express.com/content/1/1/7> [Acesso em: 18 de outubro de 2014].

KAWAGUTI, H.Y. & SATO, H.H. (2008). Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. *Química Nova*. 31(1). p. 134-143.

KAWASSAKI, F. (2011). *Efeito da região de plantio, cultivares, safras e parboilização sobre compostos fenólicos com atividade antioxidante em arroz integral produzido no Brasil*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.

KOETZ, P.R., FARIA, O.L.V., NUNES, W.A., NEVES, S. K. (2005). Full scale experience with anaerobic (UASB) – Aerobic treatment of parboiled rice wastewater. In: *VIII Simposio Latinoamericano sobre Digestion Anaerobia*. Punta del Este. Punta del Este: IWA. p. 489-492.

KUMAR, V., DHALL, P., KUMAR, R., SINGH, Y.P. & KUMAR, A. (2012). Bioremediation of agro-based pulp mill effluent by microbial consortium comprising autochthonous bacteria. *TheScientificWorldJournal*. [Online] 2012. 7 p. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3289953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. [Acesso em: 29 de outubro de 2014].

LEE, S., LILLEHOJ, H.S., PARK, D.W., HONG, Y.H. & LIN, J.J. (2007). Effects of *Pediococcus*- and *Saccharomyces*-based probiotic (MitoMax) on coccidiosis in broiler chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 30 (4). p. 261–8.

LESSARD, M., DUPUIS, M., GAGNON, N., NADEAU, E., MATTE, J.J., GOULET, J., FAIRBROTHER, J.M. (2009). Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *Journal of Animal Science*. 87 (3). p. 922-34.

LIMA, E. (2003). *Pós-tratamento em reator com recheio de pedra calcária de efluentes da parboilização do arroz tratados em reator UASB*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

LING, J., NIP, S. & SHIM, H. (2013). Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. *Bioresource technology*. 146. p. 301–9.

LING, J., NIP, S., CHEOK, W.L., DE TOLEDO, R.A. & SHIM, H. (2014). Lipid production by a mixed culture of oleaginous yeast and microalga from distillery and domestic mixed wastewater. *Bioresource technology*. 173. p. 132–9.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2014). *Arroz*. [Online] Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. [Acesso em: 04 de novembro de 2014].

MATHUR, S. & SINGH, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 105. p. 281-295.

MATOS, A.T. (2005). *Tratamento de resíduos agroindustriais*. Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

MENDONÇA, L.C. (2002). *Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido*. Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil, área de Hidráulica e Saneamento. São Carlos: Universidade de São Paulo.

NIGAM, J.N. (1999). Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *Journal of Biotechnology*. 72 (3). p. 197–202.

PEREIRA, A.R.B. & FREITAS, D.A.F. (2012). Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. [Online] 6 (6). p. 975 – 1006. Disponível em: [http://www.tratamentodeagua.com.br/R10/Lib/Image/art\\_737726757\\_4818-22161-2-PB.pdf](http://www.tratamentodeagua.com.br/R10/Lib/Image/art_737726757_4818-22161-2-PB.pdf). [Acesso em: 05 de novembro de 2014].

QUEIROZ, M.I., JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L.Q., BASTOS, R.G., GOLDBECK, R. (2007). The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*. 98 (11). p. 2163–2169.

RAJPUT, I.R., LI, L.Y., XIN, X., WU, B.B., JUAN, Z.L., CUI, Z.W., YU, D.Y. & LI, W.F. (2013). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poultry Science*. 92 . p. 956–965.

RODRIGUES, R.S., & KOETZ, P.R. (1996). Remoção de nitrogênio de efluente da indústria de arroz parboilizado por incorporação em biomassa celular de *Candida utilis*-IZ-1840. *Revista Brasileira de Agrociência*. 2 (3). p. 141-146.

ROOS, T.B., TABELÃO, V.C., DUMMER, L.A., SCHWEGLER, E., GOULART, M.A., MOURA, S.V., CORREA, M.N., LEITE, F.P.L. & GIL-TURNES, C. (2010). Effect of *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. *Food Agricultural Immunology*. 21 (2). p.113-118.

SANTOS, C., LUCAS, M.S., DIAS, A.A, BEZERRA, R.M.F., PERES, J.A. & SAMPAIO, A. (2014). Winery wastewater treatment by combination of *Cryptococcus laurentii* and Fenton's reagent. *Chemosphere*. 117 (2014). p. 53–8.

SCHNEID, A.S., GIL DE LOS SANTOS, J.R., ELÍAS JR., M. & GIL-TURNES, C. (2004). Wastewater of rice parboiling process as substrate for probiotics. In: *2nd International Probiotic Conference*. Kosice, Slovakia. p. 66.

SILVEIRA, B.I., PENAFORT, M.S., ALVES, C.D.L. (2007). Avaliação do desempenho de um reator UASB de uma planta industrial de tratamento de efluentes líquidos. In: *1 International Workshop Advances in Cleaner Production*. São Paulo. São Paulo: UNIP. 6 p.

SOARES, E.V. & SOARES, H.M. (2012). Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environmental Science and Pollution Research International*. 19 (4). p. 1066-83.

SOARES, E.V. & SOARES, H.M. (2013). Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97 (15). p. 6667-75.

STELLA, A.V., PARATTE, R., VALNEGRI, L., CIGALINO, G., SONCINI, G., CHEVAUX, E., DELL'ORTO, V., SAVOINI, G. (2007). Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research*. 67. p. 7–13.

STORCK, C.R., SILVA, L.P. & COMARELLA, C.G. (2005). Influência do processamento na composição nutricional de grãos de arroz . *Alimentos e Nutrição*. 16 (3). p. 259–264.

TUOHY, K.M., PROBERT, H.M., SMEJKAL, C.W. & GIBSON, G.R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*. [Online] 8(15). p. 692–700. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644603027466>. [Acesso em: 31 de outubro de 2014].

VON SPERLING, M., FREIRE, V.H., CHERNICHARO, C.A.L. (2000). Performance evaluation of an UASB: activated sludge system treating municipal wastewater. In: *World Water Congress of the International Water Association*. Paris. Paris: IWA. p. 94-100.

WATANABE, T., IEFUJI, H. & KITAMOTO, H.K. (2013). Treatment of, and *Candida utilis* biomass production from shochu wastewater; the effects of maintaining a low pH on DOC removal and feeding cultivation on biomass production. *Springer Plus*. 514 (2). p. 1–7.

WATANABE, T., MASAKI, K., IWASHITA, K., FUJII, T. & IEFUJI, H. (2009). Treatment and phosphorus removal from high concentration organic wastewater by the yeast *Hansenula anomala* J224 PAWA. *Bioresource Technology*. 100 (5). p. 1781–1785.

ZEPKA, L.Q., JACOB-LOPES, E., GOLDBECK, R., QUEIROZ, M.I. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica nageli* submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*. 47. p. 1305–1310.