

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA-PPGQB

**DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS AGRÍCOLAS POR
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE BAGAÇO DE CANA E
SEU PERCOLADO, E DE EFLUENTES DE AGROINDÚSTRIA**

KELLY FERNANDA SEÁRA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química e Biotecnologia da Universidade
Federal de Alagoas, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências – área de
concentração: Biotecnologia.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ana Maria Queijeiro López

MACEIÓ, ESTADO DE ALAGOAS

Fevereiro, 2008

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586d Silva, Kelly Fernanda Seára da.
Degradação de resíduos sólidos agrícolas por microrganismos isolados de bagaço de cana e seu percolado, e de efluentes de agroindústria / Kelly Fernanda Seára da Silva. – Maceió, 2008.
xxiii, 160 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Ana Maria Queijeiro López.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2008.

Bibliografia: f. 121-150.
Anexos: f. 151-160.

1. Bagaço de cana. 2. Compostagem. 3. Celulose. 4. Lignina. 5. Enzimas.
6. Microrganismos. 7. Diversidade microbiana. I. Título.

CDU: 579.26



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Kelly Fernanda Seára da Silva intitulada: "**Degradação de Matéria Orgânica de Resíduos Sólidos Agrícolas por Microrganismos Isolados de Bagaço de Cana e seu Percolado, e de Efluentes de Agroindústria**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 25 de fevereiro de 2008, às 14hs na sala de Reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Ana Maria Queijeiro López
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL
CPF:057.628.118-24

Prof. Dr. Cleide Mara Faria Soares
ITP/SE
CPF: 071.228.238-65

Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
PPGQB/IQB/UFAL
CPF: 283.589.966-91

Dedico este trabalho à minha família por
todo amor, confiança, incentivo e sacrifícios dedicados à
minha educação

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) e à S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento deste projeto;

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Queijeiro López, pela orientação, paciência, incentivo e por seus valiosos conselhos e ensinamentos. Sobretudo pelo voto de confiança e oportunidade, além de me proporcionar crescimento profissional e humano.

Ao amigo Natalino Perovano Filho, pelas valiosas contribuições, companheirismo e apoio.

À amiga Elane Cristina Lourenço dos Santos, pelas contribuições indispensáveis durante os experimentos de compostagem e execução das análises e por seu companheirismo.

Aos demais colegas do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBVMA), pela convivência, apoio, ensinamentos compartilhados, pelos momentos de trabalho e descontração.

À grande amiga Maria da Soledade Rolim do Nascimento, que apesar da distância geográfica, sempre esteve presente através de seu apoio constante, compreensão e incentivo.

À todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE QUADROS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS	xix
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. O Setor Sucroalcooleiro Brasileiro	6
3.1.1. A Produção de Álcool	12
3.2. Geração de Resíduos da Indústria Sucroalcooleira	13
3.2.1. Palha da Cana-de-Açúcar	15
3.2.2. Torta de Filtro	16
3.2.3. Vinhaça	17
3.2.4. Bagaço de Cana-de-Açúcar	19
3.3. Composição da Biomassa Vegetal	21
3.3.1. Celulose	21
3.3.2. Hemicelulose	24
3.3.3. Lignina	26
3.3.4. Glicoproteínas	29
3.4. Compostagem	30
3.4.1. Fatores que Afetam o Processo de Compostagem	33
<i>a) Umidade</i>	34
<i>b) Aeração</i>	35
<i>c) Temperatura</i>	36
<i>d) Concentração de Nutrientes</i>	37
<i>e) Tamanho das Partículas</i>	38

f) <i>Potencial Hidrogeniônico (pH)</i>	38
3.4.2. Métodos de Compostagem	39
a) <i>Windrows</i>	39
b) <i>Pilhas estáticas aeradas</i>	40
c) <i>In-vessel</i>	41
d) <i>Vermicompostagem</i>	41
3.5. Percolados Resultantes de Processos de Compostagem	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. COLETA E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS EM AMOSTRAS DE RESÍDUOS LÍQUIDOS E SÓLIDOS ORIUNDOS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR	44
4.1.1. Isolamento dos Microrganismos	46
4.2. MEIOS DE CULTIVO PARA ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	47
4.2.1. Ágar - Caldo de Cana (ACC)	47
4.2.2. Ágar-Nutriente (AN) e/ou Caldo Nutriente (CN)	47
4.2.3. Ágar - Sabouraud (AS)	48
4.2.4. Batata – Dextrose - Ágar (BDA)	48
4.2.5. Ágar - Extrato de Malte (AEM)	48
4.2.6. Ágar - Extrato de Levedura (AEL)	48
4.2.7. Ágar - Bagaço de Cana (ABC)	48
4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFO-CULTURAL E BIOQUÍMICA DOS MICRORGANISMOS	49
4.3.1. Aspectos Morfológicos	49
4.3.2. Aspectos Bioquímicos e Fisiológicos	49
4.3.2.1. <i>Atividade Carboximetilcelulolítica</i>	50
4.3.2.2. <i>Atividade Amilolítica</i>	50
4.3.2.3. <i>Atividade Proteolítica</i>	51
4.3.2.4. <i>Atividade Pectinolítica</i>	51
4.3.2.5. <i>Atividade Xilanolítica</i>	52
4.3.2.6. <i>Atividade Lipolítica</i>	52

4.3.2.7. Atividade Ligninolítica	52
4.3.2.8. Atividade Fenolítica	53
4.3.2.9. Atividade Ureásica	53
4.4. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE CELULASE	54
4.4.1. Fermentação Submersa	54
4.4.2. Fermentação Semi-Sólida	54
4.5. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS	55
4.5.1. Glicídios Redutores	55
4.5.2. Proteínas Totais	55
4.5.3. Fenóis Totais	56
4.5.4. Atividade Celulolítica	56
4.6. COMPOSTAGEM	56
4.6.1 Microrganismos Utilizados no Processo de Compostagem	56
4.6.2. Substrato Utilizado	57
4.6.3. Procedimento para Compostagem	57
4.6.4. Parâmetros Avaliados no Processo de Compostagem	57
4.6.4.1. Temperatura	57
4.6.4.2. pH e Condutividade Elétrica	58
4.6.4.3. Umidade 60-65°C	58
4.6.4.4. Umidade 100-110°C	58
4.6.4.5. Matéria Orgânica Total	59
4.6.4.6. Carbono Orgânico	59
4.6.4.7. Determinação de Fosfato	60
4.6.4.8. Detecção de Nitrato (NO ₃)	60
4.6.4.9. Detecção de Nitrito (NO ₂)	61
4.6.4.10. Crescimento Celular (UFC e Contagem de Células)	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62

5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM RESÍDUOS GERADOS NO PROCESSAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR	62
5.2	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES ESTUDADAS	77
5.3.	PRODUÇÃO DE CELULASE POR <i>Nocardia</i> sp	93
5.4.	COMPOSTAGEM DE BAGAÇO DE CANA E TORTA DE FILTRO	100
5.4.1.	SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA COMPOSTAGEM	100
5.4.2.	MONITORAMENTO DO POTENCIAL DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM	100
6.	CONCLUSÕES	119
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
	Anexo	151

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Produção mundial em toneladas de açúcar correspondente à safra 2005/06. Fonte: (USDA, 2005 <i>apud</i> CARVALHO 2006).....	6
Figura 2. Evolução da produção da cana-de-açúcar no Brasil entre as safras 1948/49 à 2005/06 Fonte: MAPA (2007).....	9
Figura 3. Evolução da distribuição espacial da área plantada de cana-de-açúcar no Brasil por microrregião (ha). Fonte: CARVALHO (2006).....	11
Figura 4. Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D-glicose. Fonte: (MORAIS <i>et al.</i> , 2005).....	22
Figura 5. Glicídios que compõem as unidades de hemiceluloses. Fonte: (MORAIS <i>et al.</i> , 2005).....	24
Figura 6. Precursores básicos na formação da lignina. Ácido chiquímico e seus 3 derivados. Fonte: (BUDZIAK <i>et al.</i> , 2004).....	26
Figura 7. Estrutura esquemática da molécula de lignina. FONTE: (PÉREZ <i>et al.</i> , 2002).....	28
Figura 8. Evolução da temperatura nas diversas fases da compostagem. Fonte: BARREIRA (2005).....	36
Figura 9. Esquema das lagoas da estação de tratamento de efluentes gerados na matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe – AL)....	44
Figura 10. Depósito de bagaço de cana proveniente do processamento industrial no final da safra 2004/05 e início da safra 2005/06 de cana-de-açúcar na matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool.....	45
Figura 11. Líquido percolado do bagaço de cana-de-açúcar acumulado na área lateral da unidade industrial da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, e coletado no início da safra 2005/06.....	46
Figura 12. Aspecto cultural de alguns microrganismos isolados do efluente das lagoas facultativas G e CL da E.T.E. da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, 3 a 5 dias após a inoculação em diferentes meios de cultura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro). a) bactéria G1 em meio Agar-Nutriente (AN); b) Fungo filamentoso G2 em meio Bagaço de Cana-Ágar (BC); c) bactéria G3 em meio BC; d) bactéria G4 em meio BC; e) bactéria G6 em meio BC; f)	

Levedura G7 em meio BC; g) bactéria G8 em meio (BC); h) bactéria G9 em meio BC; i) bactéria CL em meio AN.....	63
Figura 13. Aspecto cultural de alguns microrganismos isolados de bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após 3 a 5 dias de incubação em meio Bagaço de Cana-Ágar (BC), a 30 ±1°C, no escuro. a) bactéria BC1; b) bactéria BC2; c) bactéria BC3; d) Levedura BC4.....	66
Figura 14. Aspecto cultural de alguns microrganismos isolados de bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após 3 a 5 dias de incubação em diferentes meios de cultura (30 ± 1°C, escuro). a) Levedura BC5 em meio Bagaço de Cana-Ágar (BC); b) bactéria BC6 em meio BC; c) bactéria BC7 em meio BC; d) Fungo filamentoso BC8 Sabouraud; e) Levedura BC9 em meio BC; f) Fungo filamentoso BC10 em meio Sabouraud.....	66
Figura 15. Aspecto cultural de alguns microrganismos isolados do percolado do bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após 3 a 5 dias de incubação em diferentes meios de cultura (30 ±1°C, escuro). a) bactéria PB10 em Ágar Nutriente (AN); b) bactéria PB11 em meio AN; c) bactéria PB12 em meio Bagaço de Cana-Ágar (BC); d) bactéria PB13 em meio BC; e) bactéria PB15 em meio BC.....	70
Figura 16. Aspecto cultural de alguns microrganismos isolados do percolado do bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, após 3 a 5 dias de incubação em diferentes meios de cultura (30 ±1°C, escuro). a) bactéria PB3 em meio Ágar Nutriente (AN); b) bactéria PB4 em meio Sabouraud; c) bactéria PB5 em meio Bagaço de Cana-Ágar (BC); d) bactéria PB6 em meio BC; e) bactéria PB7 em meio BC; f) bactéria PB8 em meio BC.....	71
Figura 17. Reações bioquímicas do teste API 20E (Biomerieux) para os isolados G1, G8, G11 e CL1 oriundos da E.T.E. do processo industrial na matriz S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool na safra 2005/06, após 24 h de incubação a 35 ± 1°C, no escuro. As letras de “a” a “u” referem-se aos substratos descritos no Quadro 8 , cujas siglas são: a) ONPG; b) ADH; c)	

LDC; **d)** ODC; **e)** CIT; **f)** H₂S; **g)** URE; **h)** TDA; **i)** IND; **j)** VP; **l)** GEL; **m)** GLU; **n)** MAN; **o)** INO; **p)** SOR; **q)** RHA; **r)** SAC; **s)** MEL; **t)** AMY; **u)** AR..... 75

Figura 18. Reações bioquímicas do teste API 20E (Biomerieux) para os isolados PB3, PB7 E PB8, oriundos do percolado do bagaço de cana-de-açúcar acumulado, oriundo do processo industrial na matriz S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool na safra 2005/06, após 24 h de incubação a 35 ± 1°C, no escuro. As letras de “a” a “u” referem-se aos substratos descritos no **Quadro 8**, cujas siglas são: **a)** ONPG; **b)** ADH; **c)** LDC; **d)** ODC; **e)** CIT; **f)** H₂S; **g)** URE; **h)** TDA; **i)** IND; **j)** VP; **l)** GEL; **m)** GLU; **n)** MAN; **o)** INO; **p)** SOR; **q)** RHA; **r)** SAC; **s)** MEL; **t)** AMY; **u)** ARA..... 76

Figura 19. Percentual de microrganismos isolados de bagaço de cana e seu percolado, e de efluentes das lagoas facultativas G e CL da ETE, da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2005/06) capazes de produzir diferentes enzimas..... 78

Figura 20. Atividades enzimáticas reveladas por halo descolorido ao redor da colônia de *Nocardia* sp, isolada do líquido percolado do depósito de bagaço oriundo dos processos industriais da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool. **A)** lignolítica. **B)** celulolítica (revelação com solução de vermelho do Congo 0,1%)..... 79

Figura 21. Crescimento de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), em meio de carboximetilcelulose, sob condição de aeração e sem aeração (30 ± 1°C, escuro)..... 94

Figura 22. Crescimento de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento da cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), em meio de contendo bagaço de cana, sob condição de aeração e sem aeração (30 ± 1°C, escuro)..... 94

Figura 23. Cinética do conteúdo de glicídios redutores totais em cultura contendo carboximetilcelulose, sob condições de aeração e sem aeração (30 ± 1°C, escuro) de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 95

2005/06).....

Figura 24. Cinética do conteúdo de glicídios redutores totais em cultura contendo bagaço de cana sob condições de aeração e sem aeração ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro) de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06)..... 95

Figura 25. Cinética do conteúdo de proteínas totais em cultivos de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), contendo carboximetilcelulose, sob condições de aeração e sem aeração ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro)..... 97

Figura 26. Cinética do conteúdo de proteínas totais em cultivos de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), contendo bagaço de cana, sob condições de aeração e sem aeração ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro)..... 97

Figura 27. Atividade celulolítica (eq. mg de glicose \cdot mL⁻¹) em cultivos de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), contendo carboximetilcelulose ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro, aerado e não aerado)..... 98

Figura 28. Atividade celulolítica (eq. mg de glicose \cdot mL⁻¹) em cultivos de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), contendo bagaço de cana ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro, aerado e não aerado)..... 98

Figura 29. Cinética do conteúdo de fenóis simples (eq. mg.mL⁻¹ de ácido gálico) em cultivos aerados e não aerados ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, escuro) de *Nocardia* sp, isolado do percolado do bagaço proveniente do processamento de cana na S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), contendo bagaço de cana..... 99

Figura 30. Aspecto da implantação do sistema de compostagem do bagaço de cana (BC) + torta de filtro (TF) em casa de vegetação, no início do período de compostagem (“a” e “b”) e após 48 dias de compostagem (“c” e “d”) sob ação do consórcio CM1. a) e c) BC recente (safra 2006/07) + TF; b) e d) BC estocado (safra 2005/06) + TF.....	101
Figura 31. Aspecto da implantação do sistema de compostagem do bagaço de cana (BC) + torta de filtro (TF) em casa de vegetação, no início do período de compostagem (“a” e “b”) e após 48 dias de compostagem (“c” e “d”) sob ação do consórcio CM2. a) e c) BC recente (safra 2006/07) + TF; b) e d) BC estocado (safra 2005/06) + TF.....	102
Figura 32. Logarítimo do número de células $\cdot g^{-1}$ dos diferentes microrganismos do consórcio CM1 em material em compostagem (bagaço de cana recente + torta de filtro; bagaço de cana estocado + torta de filtro) durante 48 dias de compostagem em condições de casa de vegetação.....	105
Figura 33. Logarítimo do número de UFC. g^{-1} dos diferentes microrganismos do consórcio CM1 crescidas em meio sólido (AN) , 24 h após as coletas em material em compostagem (bagaço de cana recente + torta de filtro; bagaço de cana estocado + torta de filtro), durante 48 dias sob condições de casa de vegetação.....	105
Figura 34. Logarítimo do número de células $\cdot g^{-1}$ dos diferentes microrganismos do consórcio CM2 em material em compostagem (bagaço de cana recente + torta de filtro; bagaço de cana estocado + torta de filtro) durante 48 dias de compostagem em condições de casa de vegetação.....	106
Figura 35. Logarítimo do número de UFC. g^{-1} dos diferentes microrganismos do consórcio CM2 crescidas em meio sólido (AN e Sabouraud), 24 h após as coletas em material em compostagem (bagaço de cana recente + torta de filtro; bagaço de cana estocado + torta de filtro), durante 48 dias sob condições de casa de vegetação.....	106
Figura 36. Variação da temperatura em material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM1, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação.....	107
Figura 37. Variação da temperatura em material em compostagem (bagaço	107

de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM2, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação.....

Figura 38. Variação do potencial hidrogeniônico (pH) em material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM1, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação..... 108

Figura 39. Variação do potencial hidrogeniônico (pH) em material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM2, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação..... 108

Figura 40. Variação da condutividade elétrica no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM1, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação..... 109

Figura 41. Variação da condutividade elétrica no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM2, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação..... 109

Figura 42. Percentual de umidade no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM1, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação..... 111

Figura 43. Percentual de umidade no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM2, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação..... 111

Figura 44. Percentual de matéria orgânica no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado como o consórcio microbiano CM1, ao longo de 48 dias sob condições de casa de vegetação..... 112

Figura 45. Evolução da matéria orgânica do material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), sob ação do consórcio microbiano 2 (CM2), durante 48 dias em condições de casa de vegetação..... 112

Figura 46. Conteúdo de nitrato ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ de substrato) presente no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado pelo consórcio microbiano CM1, ao longo de 48 dias em condições de casa de 114

vegetação.....

Figura 47. Conteúdo de nitrato ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ de substrato) presente no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado pelo consórcio microbiano CM2, ao longo de 48 dias em condições de casa de vegetação..... 114

Figura 48. Conteúdo de fosfato ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato) presente no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado pelo consórcio microbiano CM1, ao longo de 48 dias em condições de casa de vegetação..... 116

Figura 49. Conteúdo de fosfato ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato) presente no material em compostagem (bagaço de cana + torta de filtro), inoculado pelo consórcio microbiano CM2, ao longo de 48 dias em condições de casa de vegetação..... 116

Figura 50. a) Câmara de incubação do sistema de identificação API 20E com água destilada estéril, **b)** Galerias API 20E contendo meios/substratos desidratados. **c)** Sistema de identificação inoculado com suspensão bacteriana, sendo algumas cúpulas preenchidas com óleo mineral (ADH, LDC, ODC, H_2S , URE)..... 159

Figura 51. Sistemas API 20E inoculados com diferentes microrganismos, mantidos por 24 h em estufa incubadora, a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 160

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação dos métodos de compostagem.....	34
Tabela 2. Parâmetros avaliados ao longo de 48 dias de compostagem de bagaço de cana (Recente safra 2006/07 e Estoque safra 2005/06) + torta de filtro, inoculado pelo consórcio microbiano 1 (CM1) em condições de casa de vegetação.....	103
Tabela 3. Parâmetros avaliados ao longo de 48 dias de compostagem de bagaço de cana (Recente safra 2006/07 e Estoque safra 2005/06) + torta de filtro, inoculado pelo consórcio microbiano 2 (CM2) em condições de casa de vegetação.....	104

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Indicadores de desempenho industrial brasileiro no processamento da cana-de-açúcar entre 1971-2007.....	11
Quadro 2. Aspectos morfológicos e bioquímicos de cinco microrganismos isolados de amostras de efluentes das lagoas facultativas G e CL da E.T.E. da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06)...	64
Quadro 3. Aspectos morfológicos e bioquímicos de cinco microrganismos isolados de amostras de efluentes das lagoas facultativas G e CL da estação E.T.E. da matriz da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06).....	65
Quadro 4. Aspectos morfológicos e bioquímicos de cinco microrganismos isolados em amostras de bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (depósito acumulado da safra 2004/2005 e da 1ª semana de moagem 2005/2006)....	68
Quadro 5. Aspectos morfológicos e bioquímicos de cinco microrganismos isolados em amostras de bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (depósito acumulado da safra 2004/2005 e da 1ª semana de moagem 2005/2006)....	69
Quadro 6. Aspectos morfológicos e bioquímicos de cinco microrganismos isolados em amostras de líquido percolado de bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (depósito acumulado da safra 2004/2005).....	72
Quadro 7. Aspectos morfológicos e bioquímicos de seis microrganismos isolados em amostras de bagaço de cana-de-açúcar do processo industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (depósito acumulado da safra 2004/2005).....	73
Quadro 8. Reações bioquímicas do sistema API 20E (Biomerieux) e testes complementares, para os isolados G1, G8, G11, CL1, PB3, PB7 e PB8, das lagoas facultativas G-CL e do percolado do bagaço de cana-de-açúcar, oriundos do processamento industrial da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06), e incubados por 24 h a 35 ± 1°C, escuro.....	74

Quadro 9. Microrganismos isolados em resíduos sólidos (bagaço) e líquidos (percolado do bagaço e efluentes da E.T.E.) oriundos do processamento da cana de açúcar da matriz da S.A Usina Coruripe Açúcar e Álcool (safra 2005/06).....

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

ABC	Ágar - bagaço de cana
ACC	Ágar - caldo de cana
AEL	Ágar - extrato de levedura
AEM	Ágar - extrato de malte
AN	Agar nutriente
ANP	Agência Nacional do Petróleo
AS	Agar sabouraud
ASB	Albumina de soro bovino
BAAR	Bastonetes álcool-ácido resistentes
BDA	Batata – dextrose - ágar
BC	Bagaço de cana
C	Carbono
°C	Graus Celsius
CN	Caldo nutriente
C/N	Relação carbono/ nitrogênio
CBH	Celobiohidrolases
CH ₄	Metano
CL	Lagoa facultativa Capitação lateral
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
CO ₂	Gás carbônico
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
C-S	Centro-sul
Cu	Cobre
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DIEESE	Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Sócio-Econômicos
DNSA	3,5-ácido dinitrosalicílico
DQO	Demanda química de oxigênio

EC	Enzyme Commission
EMB	Meio eosina azul de metileno
EG	Endoglucanases
E.T.E.	Estação de Tratamento de Efluentes
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fe	Ferro
g	Gramma
G	Lagoa facultativa G
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
ha	Hectare
IAA	Instituto do Açúcar e do Alcool
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
K	Potássio
Kcal	Quilo caloria
KDa	Quilo Dalton
Kg	Quilo
LBPVMA	Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental
LiP	Lignina peroxidase
µL	Microlitro
MAFF	Ministry of Agriculture, Food and Fisheries
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
Mn	Manganês
MnP	Manganês peroxidase
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro

N-NE	Norte-nordeste
NO ₂	Nitrato
NO ₃	Nitrito
NPK	Relação entre sódio, fosfato e potássio
O ₂	Oxigênio molecular
OF	Oxidação-fermentação
P	Fósforo
PB	Percolado do bagaço
pH	Potencial hidrogeniônico
Planalsucar	Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar
PRHP	Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
PRP	Glicoproteínas ricas em prolina
RIDESA	Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
Rpm	Rotações por minuto
SH	Substâncias húmicas
SIM	Sulfito–Indol–Motilidade
TF	Torta de Filtro
ton	Tonelada
TSI	Triple sugar iron (Três Açúcares e Ferro)
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFC	Unidade formadora de colônia
UNICA	União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo
USDA	United States Department of Agriculture
VM	Caldo Vermelho de Metila
Zn	Zinco

RESUMO

Degradação de Resíduos Sólidos Agrícolas por Microrganismos Isolados de Bagaço de Cana e seu Percolado, e de Efluentes de Agroindústria.

O Brasil ocupa um lugar de destaque tanto no setor produtivo quanto no aproveitamento agrícola dos resíduos da cana-de-açúcar. Este aproveitamento constitui-se numa prática bastante generalizada, tanto para os efluentes, principalmente a vinhaça, como também para os descartes sólidos, como a torta de filtro e o bagaço de cana. Deste modo, no início da safra 2005/06, foram coletadas amostras de águas resíduárias da E.T.E. (estação de tratamento de efluentes), bagaço de cana e percolado desse bagaço (acumulado desde a safra 2004/05) oriundos do processamento industrial da cana-de-açúcar na S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, visando o isolamento de microrganismos produtores de enzimas extracelulares capazes de degradar celulose, hemicelulose, lignina e fenóis. Foram inicialmente isolados 42 microrganismos, dos quais 31 foram triados para a verificação da produção dessas e outras enzimas, bem como para sua identificação morfo-bioquímica. Destes, 29 microrganismos foram identificados, havendo a predominância dos gêneros *Flavobacterium*, *Chromobacterium* e *Achromobacter*. Os demais isolados bacterianos pertencem aos gêneros *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Nocardia*, *Kurthia*, *Mycobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, e *Actinomyces*. Entre os isolados fúngicos, os gêneros detectados foram: *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Gonatotryps* e *Gliocladium*. O actinomiceto *Nocardia* (PB4), oriundo do percolado do bagaço, apresentou um amplo espectro de atividades enzimáticas, sendo selecionado para avaliação de sua atividade celulolítica em meios líquidos contendo carboximetilcelulose e bagaço de cana como fonte de carbono. Avaliou-se a produção de celulase a partir destes substratos, bem como a liberação de glicídios redutores, proteínas totais e fenóis totais. Além deste isolado, outros 5 microrganismos foram escolhidos, devido ao seu potencial em degradar celulose, xilana, lignina e fenóis em meio sólido, para execução de um processo de compostagem de bagaço de cana (oriundo da moagem das safras 2005/06 e 2006/07) e torta de filtro (safra 2006/07), em escala de casa de vegetação, durante 48 dias. Estes foram distribuídos em 2 consórcios (CM1 e CM2) compostos por 3 microrganismos cada. Fatores como temperatura, umidade, teor de matéria orgânica, nitrato, nitrito, carbono orgânico e fosfato foram avaliados a fim de acompanhar o processo de compostagem desses substratos sem adição de outros macro ou micronutrientes. A partir das análises físico-químicas, verificou-se que não ocorreram grandes variações no desempenho de ambos os consórcios, e que ambos conduziram a uma redução da concentração de matéria orgânica e disponibilização de nitrato e fosfato. Constatou-se que nas condições e período do estudo (48 dias, bandejas largas com uma superfície de exposição do volume de substrato utilizado suscetível a trocas de temperatura com o ambiente, e não adição de outras fontes de nitrogênio e fósforo), o material não atingiu a estabilização. Contudo, os microrganismos aqui apresentados, apresentam amplo potencial para exploração em processos de compostagem de resíduos agroindustriais sólidos/líquidos, desde que se corrijam as relações C:N, e biorremediativos, devido ao seu amplo espectro de atividades enzimáticas. Sugere-se uma combinação dos resíduos sólidos com um percentual de vinhaça, visto esta ser rica nos nutrientes que influenciaram a ação dos microrganismos estudados.

Palavras-chave: Bagaço de cana, Compostagem, Microrganismos, Celulose, Lignina, Enzimas, Diversidade microbiana.

ABSTRACT

Degradation of Agricultural Solid Wastes by Microorganisms Isolated from Sugarcane bagasse, and its Percolated, and of Effluents from Agri-industry.

Brazil occupies a place of prominence in the productive sector, as well as in the exploitation of agricultural waste, from sugar cane. This use is a fairly widespread practice, both for effluents, mainly vinasse, but also for solid residues, such as filter-cake and bagasse from sugar cane. Thus, at the start of the 2005/06 harvest, samples were collected from residual waters of the S.T.E. (Station for the treatment of effluents), bagasse and from the filtrate liquid (percolate) from bagasse that was accumulated since the 2004/05 harvest, from the industrial processing of sugar cane in "S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool". The target was the isolation of microorganisms that produce extracellular enzymes able to degrade cellulose, hemicellulose, and lignin phenols. There were originally 42 microorganisms isolated, of which 31 were screened for the verification of the production of these and other enzymes, as well as for their morpho-biochemistry identification. From these, 29 were identified, with the predominance of the genera *Flavobacterium*, *Chromobacterium* and *Achromobacter*. The other bacterial isolates belong to the genus *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Nocardia*, *Kurthia*, *Mycobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, e *Actinomyces*. Among the fungal isolates, the genera detected were: *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Gonatotryps* and *Gliocladium*. The actinomycete *Nocardia* (PB4), isolated from the percolate of bagasse, presented a broad spectrum of enzymatic activities, being selected for evaluation of its cellulolytic activity in liquid medium containing carboxymethylcellulose and bagasse from sugar cane as a source of carbon. The production of cellulase in these substrates was evaluated according to the concentration of reducing sugars and of total protein, and the content of total phenols has also been determined. In addition to this isolated, another 5 microorganisms were chosen - because of their cellulolytic, xylanolytic, and phenolytic activities in a solid medium, and used for implementing a process of composting of the sugar cane bagasse (from 2005/06 and 2006/07 harvests) with filter-cake (2006/07 crop), in scale of the greenhouse for 48 days. These were divided into 2 consortia (CM1 and CM2), formed by 3 microorganisms each. Factors such as temperature, moisture, organic matter content, nitrate, nitrite, phosphate and organic carbon were evaluated in order to monitor the process of composting substrates, without the addition of other macro and micronutrients. From the physico-chemical analyses, it was found that there were not wide variations in the performance of both consortia, and that both led to a reduction of the concentration of organic matter and contents of nitrate and phosphate. Besides this, in period (48 days) and in the conditions (trays with large diameter and small height, which favors changes of temperature of the substrate with the environment; non addition of other sources of nitrogen and phosphorus) of this study, the substrates do not reached stabilization. However, the microorganisms presented here, have broad potential for exploitation in cases of composting the solid and liquid agri-industrial residues, provided that relations C:N be corrected, and also in bioremediation, because of its broad spectrum of enzymatic activities. It is suggested to combine the solid waste with a percentage of vinasse, because this is rich in nutrients that influence the action of microorganisms studied.

Keywords: Sugarcane bagasse, Composting, Microorganisms, Cellulose, Lignin, Enzymes, Microbial diversity.