

PUCRS

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

PAULA THAINÁ RODRIGUES MACHADO

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA ESPÉCIE *Bacillus subtilis* NO
TRATAMENTO DE MEIO SINTÉTICO COM ALTA CARGA NITROGENADA**

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Ficha Catalográfica

M149a Machado, Paula Thainá Rodrigues

Avaliação da aplicação da espécie *Bacillus subtilis* no tratamento de meio sintético com alta carga nitrogenada / Paula Thainá Rodrigues Machado. – 2021.

76 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rosane Angélica Ligabue.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Desnitrificação. 3. Remoção de nitrogênio. I. Ligabue, Rosane Angélica. II. Título.



**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA ESPÉCIE *Bacillus subtilis* NO
TRATAMENTO DE MEIO SINTÉTICO COM ALTA CARGA NITROGENADA**

CANDIDATA: PAULA THAINÁ RODRIGUES MACHADO

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

DRA. SILVIA DIAS DE OLIVEIRA - PPGBCM - PUCRS

DRA. JEANE ESTELA AYRES DE LIMA - PGETEMA - PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA ESPÉCIE *Bacillus subtilis* NO
TRATAMENTO DE MEIO SINTÉTICO COM ALTA CARGA NITROGENADA**

PAULA THAINÁ RODRIGUES MACHADO

BACHARELADO EM QUÍMICA LINHA DE FORMAÇÃO QUÍMICA
INDUSTRIAL

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2021



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA ESPÉCIE *Bacillus subtilis* NO
TRATAMENTO DE MEIO SINTÉTICO COM ALTA CARGA
NITROGENADA**

PAULA THAINÁ RODRIGUES MACHADO

BACHARELADO EM QUÍMICA LINHA DE FORMAÇÃO QUÍMICA
INDUSTRIAL

ORIENTADORA: PROF. DR. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Agosto, 2021**

“Eu sou um universo de átomos, e ainda assim, um átomo no universo”.

(Richard Feynman)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e ao meu marido por estarem sempre ao meu lado me incentivando a ir mais longe e fornecendo todo o apoio necessário para a conquista dos meus objetivos na busca por conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, irmãos, amigos e ao meu marido por todo o apoio, entendimento e incentivo durante toda minha trajetória acadêmica.

Ao professor Rogério Vescia Lourega por todas as orientações e sugestões.

A professora Jeane Lima pelos momentos de discussão e encaminhamentos do estudo.

A minha orientadora professora Rosane Ligabue, pelas conversas orientativas, e toda a ajuda na condução deste trabalho.

À Escola Politécnica da PUCRS pelo espaço cedido para realização dos experimentos, assim como aos colegas, funcionários do Laboratório de Química aos alunos de iniciação científica Gabriel Gonçalves Ferreira Ribeiro e Leonardo Moura por todo auxílio no desenvolvimento dos experimentos.

Ao Laboratório de Imunologia e Microbiologia em especial a professora Silvia Dias de Oliveira, por disponibilizar espaço no laboratório para realização dos experimentos, assim como à equipe técnica por todo apoio.

O presente trabalho foi alcançado em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).

À Capes pela bolsa de mestrado.

Por fim agradeço a todos colegas, amigos e demais professores da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento da minha trajetória acadêmica até aqui.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Nitrogênio em efluentes	21
3.2. Tratamento de Efluentes	22
a) Tratamento preliminar	24
b) Tratamento físico.....	24
c) Tratamento biológico	25
d) Tratamento químico.....	27
3.3. Análises de Efluentes Industriais.....	28
a) Sólidos totais	29
b) Matéria orgânica.....	29
c) Nitrogênio total.....	30
d) Acidez e basicidade – valor de pH	30
3.4. Parâmetros de Descarte.....	30
3.5. Tecnologias para Remoção de Nitrogênio	32
3.5.1. Remoção lodos ativados.....	32
3.5.2. Remoção por meio de sistemas alagados (<i>Wetlands</i>).....	33
3.5.3. Remoção por volatilização	34
3.5.4. Remoção por “ <i>Stripping</i> ”	34
3.5.5. Remoção por biodiscos.....	35
3.5.6. Remoção por processos bioeletroquímicos	36
3.5.7. Remoção através de biorreatores de membranas	37
3.5.8. Remoção por nitrificação	38
3.5.9. Remoção por desnitrificação.....	39
3.5.10. Remoção por nitrificação e desnitrificação simultânea	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. Materiais	44
4.2. Cultivo das bactérias.....	46

4.3. Preparo de meios sintético – meio nitrificante e meio desnitrificante	
46	
4.4. Contato entre cepa de <i>Bacillus subtilis</i> e o meio sintético nitrificante e meio sintético desnitrificante com alta carga nitrogenada	47
4.4.1. Determinação de nitrato	48
a) Método potenciômetro: Eletrodo íon seletivo de nitrato	48
4.4.2. Determinação de amônia – Método potenciômetro: Eletrodo íon seletivo de amônia	49
4.4.3. Determinação de pH	49
4.4.4. Determinação de Densidade Óptica (DO)	50
4.4.5. Teste de Gram	50
4.5. Coleta das amostras reais	50
4.6. Caracterização das amostras reais	51
4.6.1. Determinação de amônia – Método Kjeldahl	51
4.6.2. Determinação de oxigênio dissolvido - Método de <i>Winkler</i> modificada com azida sódica	52
4.6.3. Determinação Bioquímica de Oxigênio (DBO)	53
4.6.4. Determinação Química de Oxigênio (DQO)	54
4.6.5. Determinação de pH	55
4.6.6. Determinação de metais	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Contato entre as bactérias e o meio de análise com carga nitrogenada	57
5.2. Resultados das Análises de Caracterização das amostras reais	64
6. CONCLUSÕES	67
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Ciclo Biológico do Nitrogênio (ATKINS, 2001).	21
Figura 3.2. Fluxograma do processo de tratamento – Efluente Industrial (Elaborado pelo autor).	23
Figura 3.3. Esquema das unidades da etapa biológica do sistema de lodo ativado (ROCHA, 2016).	33
Figura 3.4. Ilustração de um sistema bioeletroquímico (NAKAGAMA, 2017).	37
Figura 3.5. Produtos oriundos da reação de desnitrificação (MADIGAN, 2016).	39
Figura 4.1. Incubadora contendo as amostras para avaliação (elaborada pelo autor).	48
Figura 5.1. Densidade óptica 600nm para o Meio Desnitrificante.	58
Figura 5.2. Densidade óptica 600nm para o Meio Nitrificante.	58
Figura 5.3. Variação do pH para o Meio Desnitrificante.	59
Figura 5.4. Variação do pH para o Meio Nitrificante.	59
Figura 5.5. Concentração de Nitrato para o Meio Desnitrificante.	60
Figura 5.6. Concentração de Cloreto para o Meio Desnitrificante.	61
Figura 5.7. Concentração de Fluoreto para o Meio Desnitrificante.	62
Figura 5.8. Concentração de Sulfato para o Meio Desnitrificante.	62
Figura 5.9. Concentração de Fluoreto para o Meio Nitrificante.	63
Figura 5.10. Concentração de Fosfato para o Meio Nitrificante.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.3. Condições de lançamento de efluentes (BRASIL, 2011).....	31
Tabela 3.4. Padrões de lançamento de efluentes parâmetros Inorgânicos (BRASIL, 2011).....	31
Tabela 3.5. Padrões de lançamento de efluentes parâmetros orgânicos (BRASIL, 2011).....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Etapas do tratamento físico (GIORDANO, 2004).	25
Quadro 3.2. Tipos de lagoas de tratamento (GIORDANO, 2004).	26
Quadro 4.1. Lista de reagentes (elaborado pelo autor).	45
Quadro 4.2. Relação das amostras de avaliação das bactérias (elaborado pelo autor).	47

LISTA DE SÍMBOLOS

ABDON	Nitrogênio Orgânico Dissolvido Biodisponível	
AOB	<i>Ammonium Oxidizing Bacteria</i> (Bactérias Oxidadoras de Amônia)	
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente	
COT	Carbono Orgânico Total	
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio	mg O ₂ / L
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxigênio após 5 dias	mg O ₂ / L
DO	Densidade ótica	
DON	Nitrogênio Orgânico Dissolvido	
DQO	Demanda Química de Oxigênio	mg O ₂ / L
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes	
FD	Fator de Diluição	
HFCW	<i>Horizontal Flow Constructed Wetland</i> (Wetland Construído de Fluxo Horizontal)	
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente)	
LB	Luria Bertani	
MBR	<i>Membrane Bioreactor</i> (Biorreator de Membrana)	
MD	Meio Desnitrificante	
MN	Meio Nitrificante	
MO	Matéria Orgânica	
MSBR	<i>Membrane Sequency Batch Reactor</i> (Reator de Batelada Sequencial de Membranas)	
NOB	<i>Nitrite Oxidizing Bacteria</i> (Bactéria Oxidadora de Nitrito)	
NT	Nitrogênio Total	mg N / L
NTK	Nitrogênio Total Kjeldhal	mg N / L
OD _i	Oxigênio Dissolvido Inicial	mg O ₂ / L
OD _f	Oxigênio Dissolvido Final	mg O ₂ / L
OD ₅	Oxigênio Dissolvido após 5 dias	mg O ₂ / L
SND	Nitrificação e Desnitrificação Simultânea	
VFCW	<i>Vertical Flow Constructed Wetland</i> (Wetland Construído de Fluxo Vertical)	

RESUMO

THAINÁ RODRIGUES MACHADO, Paula. **Avaliação da aplicação da espécie *Bacillus subtilis* no tratamento de meio sintético com alta carga nitrogenada.** Porto Alegre. 2021. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

A presença do nitrogênio na atmosfera é essencial à vida, entretanto, o despejo de efluentes contendo grandes quantidades de nitrogênio em corpos receptores pode causar danos como a eutrofização, diminuição na concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) e toxicidade. Desta forma, torna-se necessário controlar e tratar adequadamente os resíduos líquidos para que estejam em conformidade com a legislação e não prejudiquem o meio ambiente. Atualmente, processos como a desnitrificação, que consiste na redução biológica do nitrato convertendo-o em nitrogênio molecular, têm se apresentado como uma alternativa viável tanto no quesito econômico quanto nas questões de empregabilidade. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de redução da carga nitrogenada presente em meio sintético pelo uso de bactérias desnitrificantes da espécie *Bacillus subtilis*. Assim como analisar um efluente industrial real, a fim de verificar parâmetros de descarte como a carga de nitrogênio, identificando-o como potencial aplicação do método. A metodologia empregada neste estudo baseia-se no monitoramento das bactérias sob suas condições ótimas de desenvolvimento, avaliando o crescimento, assim como parâmetros de pH, densidade óptica, concentração de amônia e nitrato. Com este estudo, foi possível identificar a capacidade de *Bacillus subtilis* em reduzir a carga nitrogenada presente no meio sintético, demonstrando a possibilidade de emprego da técnica no tratamento de efluentes industriais. Assim como, o efluente industrial demonstrou-se como um potencial candidato ao uso desta metodologia.

Palavras-Chaves: *Bacillus subtilis*, desnitrificação, remoção de nitrogênio.

ABSTRACT

THAINÁ RODRIGUES MACHADO, Paula. **Evaluation of the application of *Bacillus subtilis* species in the treatment of a synthetic medium with high nitrogen load.** Porto Alegre. 2021. Masters dissertation. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The presence of nitrogen in the atmosphere is essential for life, however, the discharge of effluents containing large amounts of nitrogen into receiving bodies can cause damage such as eutrophication, a decrease in the concentration of Dissolved Oxygen (DO) and toxicity. Thus, it becomes necessary to properly control and treat liquid waste so that it complies with the legislation and does not harm the environment. Currently, processes such as denitrification, which consists of the biological reduction of nitrate by converting it into molecular nitrogen, have been presented as a viable alternative both in terms of economics and in terms of employability. In this sense, this work aims to evaluate the ability to reduce the nitrogen load present in synthetic media by using denitrifying bacteria of the *Bacillus subtilis* species. As well as analyzing a real industrial effluent, in order to verify disposal parameters such as nitrogen load, identifying it as a potential application of the method. The methodology used in this study is based on monitoring the bacteria under their optimal development conditions, evaluating growth, as well as pH, optical density, ammonia and nitrate concentration parameters. With this study, it was possible to identify the capacity of *Bacillus subtilis* to reduce the nitrogen load present in the synthetic medium, demonstrating the possibility of using the technique in the treatment of industrial effluents. Likewise, industrial effluent was shown to be a potential candidate for the use of this methodology.

Key words: *Bacillus subtilis*, denitrification, nitrogen removal.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, o desenvolvimento econômico e as alterações nos padrões de consumo estão sendo aumentados continuamente, com isso inserimos diariamente uma enorme e variada gama de produtos as nossas casas. Não podemos negar o fato de que a produção de bens e serviços necessitam de diversas matérias primas, sendo a mais crítica delas a água. Entretanto, o emprego de grande quantidade de água em tais processos produtivos gera como consequência a produção de resíduos inerentes a esta prática. Pode-se dizer que ao longo do último século, tivemos um aumento de 6 vezes no consumo de água doce, ainda assim, existe uma perspectiva de que o avanço deve continuar a crescer a uma taxa de 1% ao ano (PANDEY et. al., 2021).

Considerando os níveis elevados de água utilizados pelas indústrias produtoras, torna-se inevitável a geração de efluentes líquidos. Segundo a Resolução CONSEMA nº 355/2017, o efluente líquido industrial pode ser definido como: “despejo líquido resultante de qualquer atividade produtiva, oriunda prioritariamente de áreas de transformação de matérias primas em produtos acabados” (CONSEMA, 2017).

As águas residuais industriais geralmente contêm vários poluentes, que na maioria das vezes, ameaçam seriamente o meio ambiente e a saúde humana quando não realizado o tratamento adequado prévio ao descarte (Yi et. al., 2021).

Dentro deste contexto, as questões relacionadas à água ganham destaque, devido a ela ser considerada o recurso mineral mais precioso, e essencial à vida de todos os seres vivos. Cerca de 71% da superfície terrestre é coberta por água, 97,5% dessa quantidade é salgada e o restante é água doce (BASAK et. al., 2021).

Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou-se que 1 em cada 10 pessoas (785 milhões) ainda carece de serviços básicos, incluindo os 144 milhões

que bebem águas superficiais não tratadas. Podendo ainda destacar que a cobertura de serviços básicos entre os mais ricos era pelo menos duas vezes maior do que entre os mais pobres (OMS, 2019).

Dentre as diversas formas de uso da água podemos destacar algumas delas como: abastecimento doméstico e industrial, irrigação, dessedentação de animais, aquicultura, preservação da flora / fauna, recreação e lazer, harmonia paisagística, geração de energia elétrica, navegação e diluição de despejos. Em termos gerais, apenas os dois primeiros usos estão frequentemente associados a tratamentos prévios da água, devido aos requisitos de qualidade serem mais exigentes. O abastecimento doméstico é considerado o uso mais nobre e o que requer uma qualidade superior aos outros usos, enquanto o despejo industrial tem uso menos nobre, mas também necessita de atenção para o atendimento dos requisitos legais de despejo (VON SPERLING, 1996).

O despejo de efluentes líquidos em corpos hídricos sem o devido controle causa danos ao meio ambiente principalmente à vida aquática, pois a presença de níveis elevados de nutrientes como fósforo e nitrogênio ocasionam um fenômeno denominado eutrofização, que causa o crescimento desenfreado de algas. Este fato demonstra a necessidade de tratamento dos efluentes líquidos para torná-los aptos para devolução nos corpos de água. Com isto, as Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) possuem o objetivo de remover os poluentes, os nutrientes excessivos e demais constituintes da matéria orgânica que se encontram presentes nas águas residuárias. Contudo, observa-se que muitas vezes as empresas apresentam dificuldades em atender os parâmetros exigidos por lei, principalmente quanto às cargas permitidas de nitrogênio. Esse elemento possui grande importância, pois está incluso no fluxo de matéria e da energia presentes na natureza, e é considerado essencial para o crescimento de plantas e equilíbrio do ecossistema (GERHARDT, 2017; PEREIRA, 2017).

Dentro desta problemática o presente trabalho tem como finalidade avaliar o crescimento das bactérias da espécie *Bacillus subtilis* nas suas condições ótimas de crescimento, considerando o contato da bactéria com dois diferentes meios sintéticos – um meio com caráter nitrificante e outro meio com caráter desnitrificante, avaliando a capacidade de redução da carga nitrogenada. Assim como, caracterizar os resíduos

líquidos industriais de uma empresa do ramo eletrônico, que possui efluentes com alta carga nitrogenada, verificando a possibilidade de atuação de um tratamento biológico como alternativa para a redução.

2. OBJETIVOS

Avaliar a aplicação da espécie *Bacillus subtilis* no tratamento de meio sintético com alta carga nitrogenada.

2.1. Objetivos Específicos

- Colocar bactérias desnitrificantes da espécie *Bacillus subtilis* em contato com meios sintéticos nitrificante e desnitrificante com alta carga nitrogenada;

- Avaliar o desempenho das bactérias em contato com meios sintéticos nitrificante e desnitrificante com alta carga nitrogenada;

- Medir a densidade óptica dos meios sintéticos em contato com a bactéria a fim de identificar seu crescimento;

- Medir pH e concentração de íons nitrato e amônio dos meios sintéticos em contato com a bactéria;

- Coletar e caracterizar uma amostra de efluente industrial avaliando parâmetros de descarte como a carga nitrogenada, a fim de avaliar a possibilidade do uso de bactérias desnitrificantes da espécie *Bacillus subtilis* para tratamento e redução da carga nitrogenada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Nitrogênio em efluentes

O nitrogênio é obtido em grande escala pela destilação de ar liquefeito e seus principais usos são: processamento de metais, refino de petróleo e processamento de alimentos, onde é utilizado na forma de gás como atmosfera inerte. O nitrogênio líquido (ponto de ebulição - 196 °C ou 77 K) é um agente de resfriamento conveniente tanto na indústria como no laboratório. Na indústria seu principal propósito está vinculado à produção de amônia pelo processo Haber e a conversão para ácido nítrico pelo processo Ostwald (ATKINS, 2001).

A amônia fornece uma ampla gama de compostos de nitrogênio, como fertilizantes, plásticos e explosivos. O nitrogênio desempenha um papel crucial na biologia por ser um dos constituintes dos aminoácidos e ácidos nucleicos, sendo o ciclo do nitrogênio um dos processos mais importantes no ecossistema. Na Figura 3.1, é apresentada uma ilustração que demonstra o ciclo do nitrogênio (ATKINS, 2001).

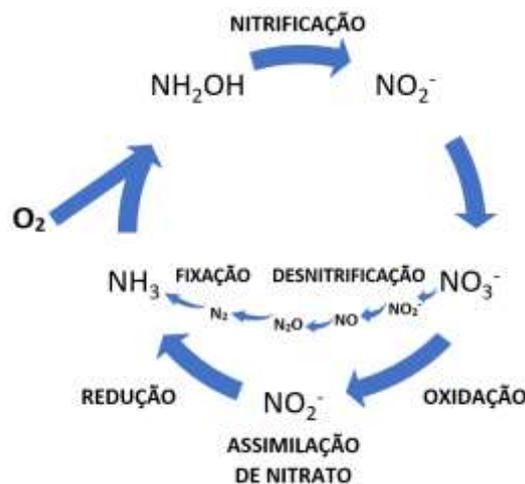


Figura 3.1. Ciclo Biológico do Nitrogênio (ATKINS, 2001).

Dentre os contaminantes encontrados nas águas residuárias, tem-se a presença do nitrogênio sob quatro diferentes formas: nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, nitrito e nitrato. A presença do nitrogênio é essencial à vida, entretanto, o despejo de efluentes que contenham grandes quantidades de nitrogênio em um corpo receptor pode causar danos tais como: a eutrofização, diminuição na concentração de

Oxigênio Dissolvido (OD) e aumento da toxicidade. Este último está relacionado tanto ao fato de o OD ser um fator limitante para manutenção da vida aquática e de processos de autodepuração em sistemas aquáticos naturais e estações de tratamento de esgotos, pois, durante a degradação da matéria orgânica, as bactérias fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, que podem vir a causar uma redução de sua concentração no meio. Quanto a toxicidade por amônia, em condições de pH elevado (frequentes durante os períodos de elevada fotossíntese), a amônia apresenta-se em grande parte na forma livre (NH_3), tóxica aos peixes, ao invés de apresentar-se na forma ionizada (NH_4^+), não tóxica. A identificação da forma predominante na qual o nitrogênio está presente nos cursos de água, possibilita a identificação do estágio de poluição. Quando se tem uma poluição recente o nitrogênio encontrado estará na forma de nitrogênio orgânico enquanto nas poluições mais antigas o nitrogênio estará na forma de nitrato devido à ação das bactérias nitrificantes, isto ocorre desde que exista quantidade suficiente de OD para permitir o processo de nitrificação (BAUR, 2012; ZOPPAS, 2012).

3.2. Tratamento de Efluentes

Os esgotos podem ser definidos como águas que, após consumo humano, seja doméstico, industrial ou comercial, apresentam alterações nas características naturais. A falta de tratamento prévio dos esgotos urbanos e efluentes industriais gera um efeito extremamente negativo nos meios hídricos, ao levar em conta o enorme consumo de água e a geração de efluentes potencialmente poluidores (CARVALHO, 2014).

A descarga excessiva de nitrogênio nos cursos de água naturais pode causar problemas ambientais graves, como a eutrofização da água e a destruição de ecossistemas aquáticos (YU, 2019).

Segundo a indicação de tratativa de efluentes do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) através do Art. 3 da Resolução N°. 430, de 13 de maio de 2011, diz que: “Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam

às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis” (BRASIL, 2011).

Considerando o desenvolvimento das atividades industriais, e o forte crescimento econômico que envolve este contexto, tem-se como consequência o aumento da produção de efluentes industriais. Com isso, se faz necessária a adoção de atividades de tratamento dos efluentes para que possam ser devidamente descartados.

As Estações de Tratamento de Efluentes são locais onde os rejeitos líquidos são recebidos ou contidos para análise dos parâmetros definidos na Resolução N°. 430, de 13 de maio de 2011, para que estes sejam tratados previamente e assim destinados adequadamente (BRASIL, 2011).

As formas de tratamento as quais os despejos podem ser submetidos são: tratamento preliminar por processos físicos, tratamento primário por processos físico-químicos, tratamento secundário por processos biológicos, e por último o emprego do tratamento químico. Na Figura 3.2., tem-se o fluxograma do processo de efluente industrial (BRASIL, 2011; GIORDANO, 2004).

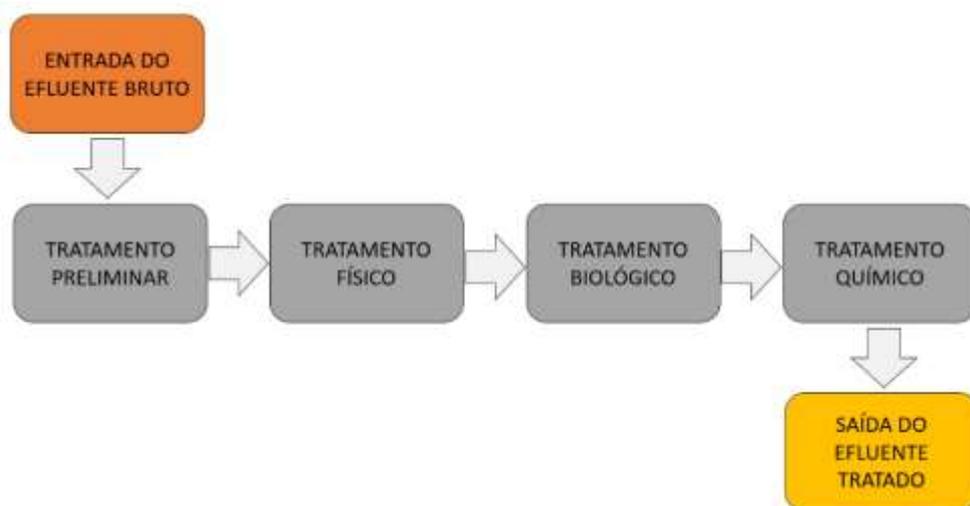


Figura 3.2. Fluxograma do processo de tratamento – Efluente Industrial (Elaborado pelo autor).

Estas etapas têm por objetivo eliminar as mais diversas substâncias indesejáveis, e possibilitar o seu retorno ao meio ambiente com características sanitárias mais adequadas do que a situação anterior de efluente bruto.

As ETE possuem etapas sequenciais, cada uma com propósito específico e que possibilitará ao fim do processo a obtenção de um efluente tratado próprio para descarte. A utilização de uma ou mais etapas é definida com base na característica do efluente em questão e as suas necessidades de tratamento como a presença de materiais sólidos dispersos, micro-organismos e excesso de nutrientes.

A seguir serão descritas as características de cada uma das etapas de tratamento de uma ETE:

a) Tratamento preliminar

Tem como propósito a remoção de sólidos grosseiros, sólidos suspensos e areia. O principal objetivo desta etapa é proteger as unidades subsequentes, bombas e tubulações e os corpos receptores evitando possíveis obstruções e facilitando o fluxo dos líquidos (VON SPERLING, 1996).

b) Tratamento físico

Consiste nos processos de separação e remoção dos sólidos em suspensão sedimentáveis e flutuantes. O gradeamento, o peneiramento, a separação de óleos e gorduras, sedimentação, filtração e a flotação são processos pertencentes a esta etapa.

Podem ser considerados pertencentes a esta etapa de tratamento aqueles processos em que há a remoção de matéria orgânica e inorgânica em suspensão coloidal e a eliminação de micro-organismos através de processos de filtração em areia ou em membranas. Como no caso dos processos que utilizam reatores de lodos ativados ou processos de polimento empregados para retenção de micro-organismos e moléculas orgânicas. As membranas de microfiltração são indicadas quando há concentração de flocos biológicos, as membranas de ultrafiltração são responsáveis pela retenção de micro-organismos e membranas de nanofiltração são capazes de reter micro-organismos e moléculas orgânicas. Assim como, quando

existe a busca pela desinfecção por meio do uso de radiação ultravioleta. No Quadro 3.1 estão descritos os procedimentos realizados em cada uma das etapas do tratamento físico (GIORDANO, 2004).

Quadro 3.1. Etapas do tratamento físico (GIORDANO, 2004).

Etapa	Objetivo e forma de atuação
Gradeamento	Remover sólidos grosseiros pela utilização de grades mecânicas ou limpeza manual.
Peneiramento	Remoção de sólidos com diâmetros superiores a 1 mm através do uso de peneiras.
Separação de óleos e gorduras	Recolhimento de óleos e/ou gorduras na superfície do rejeito do efluente por diferença de densidade
Sedimentação	Separação dos resíduos e clarificação do efluente através da contenção em reservatórios que possibilitam a decantação dos materiais mais densos.
Filtração	Retenir sólidos em suspensão através da passagem de uma mistura por um material poroso que fará a retenção dos sólidos, possibilitando a passagem da fase líquida.
Flotação	Clarificação de efluentes e concentração de lodos. Por meio de escoamento superficial em decantadores ou raspagem superficial.

c) Tratamento biológico

Ocorre pelo emprego de métodos de tratamento nos quais a remoção é feita através de atividade biológica, possibilitando a remoção da matéria orgânica dissolvida e em suspensão por meio da transformação destes em sólidos sedimentáveis, bem como comporta as metodologias de nitrificação e desnitrificação. As descrições dos processos que utilizam este tipo de tratamento serão indicadas a seguir.

O sistema de lodos ativados convencional é composto de um decantador primário, um tanque de aeração e um decantador secundário dispostos em série. O processo de tratamento de efluente utilizando lodos ativados baseia-se no fornecimento de oxigênio (ar atmosférico ou oxigênio puro), a fim de que os microorganismos degradem a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, transformando-a em gás carbônico, água e flocos biológicos formados pelos micro-

organismos característicos do processo. A técnica é empregada na separação de biomassa (flocos biológicos) dos efluentes tratados (fase líquida) (GIORDANO, 2004; CARVALHO, PASSIG e KREUTZ, 2011).

A entrada de efluentes (matéria orgânica) provoca o crescimento do lodo biológico, denominado de excesso de lodo. Esta formação se deve principalmente à presença dos nutrientes como fósforo e nitrogênio, assim como dos micronutrientes como cálcio, magnésio, enxofre, ferro, cobre, zinco, cromo, cobalto e molibdênio (GIORDANO, 2004).

Dentro desta categoria de tratamento têm-se as lagoas aeradas aeróbias e as lagoas aeradas facultativas. Os tipos de lagoa e seus funcionamentos estão descritos no Quadro 3.2.

Quadro 3.2. Tipos de lagoas de tratamento (GIORDANO, 2004).

Tipo de Lagoa	Funcionamento
Lagoa aerada aeróbia	Este tipo de lagoa opera como se fossem tanques de aeração de lodos ativados sem reciclo de lodo. A aeração é mantida de forma que toda a biomassa fique uniformemente distribuída pela massa líquida, para que não ocorra sedimentação.
Lagoa aerada facultativa	São projetadas para operarem em condições energéticas inferiores as das lagoas aeradas aeróbias. São preparadas para que nelas ocorra a etapa de sedimentação

Outra possibilidade, é a utilização de processos facultativos, os quais podem ocorrer por meio de diferentes processos como: contadores biológicos, biodiscos e filtros biológicos. Tais metodologias serão explicitadas nos parágrafos que seguem.

Os contadores biológicos rotativos (RBCs) consistem em uma técnica baseada no contato alternado entre o efluente, o suporte e o ar atmosférico. A repetição deste processo provoca a produção de biomassa ou biofilme. Os biofilmes são estruturas complexas metabolicamente ativas de bactérias, arqueias e eucariontes microbianos. Esses biofilmes se desenvolvem em substratos submersos tendo como vantagens o baixo custo operacional, estrutura simples e de baixo impacto ambiental, sendo amplamente utilizados para estabilização de

matéria orgânica e remoção de nitrogênio. Vários tipos de águas residuais podem ser tratados com RBCs, como água contaminada por metais pesados e águas residuais de corantes têxteis. No entanto, algumas características afetam a qualidade do efluente, envolvendo área de fixação inadequada, deposições consideradas lentas do biofilme e baixa taxa de transferência de oxigênio (LI, 2019; PENG, 2018; ZIM, 2006).

Os biodiscos são semelhantes aos contadores biológicos, diferindo no fato do biofilme utilizado ser suportado por placas circulares, que giram continuamente acionadas por motores de velocidade reduzida, que possibilitem uma rotação mais branda do sistema. O espessamento da camada de biofilme sobre as placas causa o desprendimento e a deposição no tanque do biodisco, de maneira a resultar na digestão do lodo, assim como também existe um decantador final que é responsável pela remoção dos materiais sedimentáveis (GIORDANO, 2004).

O tratamento com filtro biológico é considerado o mais antigo dos processos biológicos utilizado racionalmente para o tratamento de esgotos. O filtro biológico é um processo de crescimento em leito fixo, em que o efluente passa através de um leito de material inerte. O preenchimento pode ser feito pelo uso de material sintético de plásticos ou brita. Entretanto, este processo não envolve nenhum processo de peneiramento ou filtração mecânica, e sim um processo de oxidação biológica. Ainda assim, este tipo de tratamento difere do processo de biodiscos, pois tem leito fixo e a distribuição móvel. Como destaque, este tem um baixo gasto operacional, e proporciona resultados de aproximadamente 60% de redução da matéria orgânica (GIORDANO, 2004; OLIVEIRA, 2010).

d) Tratamento químico

Este tratamento ocorre por meio das reações químicas, provocadas pelo uso de produtos químicos com o propósito de remover os poluentes ou condicionar a mistura de efluentes de maneira a facilitar o seu tratamento em etapas subsequentes (GIORDANO, 2004).

O processo de clarificação química ocorre através das etapas de coagulação/floculação e tem por finalidade aglomerar impurezas que se encontram em suspensão em estado coloidal para que possam ser removidas por decantação, flotação e/ou filtração. Neste processo ocorre a ligação de pequenas partículas dispersas em grandes aglomerados que poderão ser mais facilmente removidos através de métodos físicos, como a sedimentação e filtração. A clarificação química ocorre por meio de alguns fatores como: o controle da temperatura, a agitação, agentes coagulantes químicos, processos biológicos, passagem de corrente elétrica (eletrocoagulação), ou também pela eletrocoagulação combinada a adição de coagulantes químicos, que podem ser sais de ferro ou alumínio (FORTINO, 2012; GIORDANO, 2004).

A eletrocoagulação apresenta vantagens como opção de tratamento, pois não requer um fornecimento constante de produtos químicos e, conseqüentemente, pode ser mais facilmente implementado em um contexto de país em desenvolvimento, onde esses produtos químicos não estão prontamente disponíveis. Também se apresenta como uma tecnologia eficaz de tratamento de água potável que pode ser facilmente implantada como equipamento portátil para uso em locais remotos ou em caso de emergências (ATKINS, 2001; SYMONDS, 2015).

A precipitação química costuma ser utilizada na remoção de metais pesados em efluentes inorgânicos. Ocorre através da adição de um agente alcalino que resulta na formação de hidróxidos metálicos e, conseqüentemente, na precipitação de metais devido à formação de sólidos insolúveis, após ajuste de pH básico. Para os casos de precipitações concomitantes deve-se avaliar as curvas de solubilidade dos elementos, a fim de identificar a relação entre o pH e a solubilidade (GIORDANO, 2004; MELLA, 2013).

3.3. Análises de Efluentes Industriais

Os sistemas de tratamento possuem como principal objetivo simular os fenômenos naturais em condições controladas e otimizadas, e que resultem no

aumento da velocidade e na eficiência de estabilização da matéria orgânica, bem como de outras substâncias presentes no meio (BRASIL, 2011).

A seguir são descritas as principais características das águas descartadas resultantes da utilização de diversos processos, também conhecidas como águas residuárias (GIORDANO, 2004).

a) Sólidos totais

Compreendem os sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos, dissolvidos e sedimentáveis. Os sólidos em suspensão (fração dos sólidos orgânicos e inorgânicos que são filtráveis, ou seja, não dissolvidos), podem ser classificados como: sólidos fixos (componentes minerais, não incineráveis, inertes dos sólidos em suspensão), como sólidos voláteis (componentes orgânicos dos sólidos em suspensão), ou ainda como sólidos dissolvidos (fração dos sólidos orgânicos e inorgânicos que não são filtráveis, normalmente considerados com dimensão menor que 10^{-3}). Os sólidos sedimentáveis são referentes à fração dos sólidos orgânicos e inorgânicos que sedimenta em 1 hora no cone *Inmhoff*. É a indicação aproximada da sedimentação em um tanque de decantação.

b) Matéria orgânica

Mistura heterogênea de diversos compostos orgânicos, podendo citar como os principais componentes: as proteínas, os carboidratos e os lipídeos. A matéria orgânica pode ser determinada de duas maneiras: Determinação direta (DBO_5) é a medida do oxigênio consumido após 5 dias pelos micro-organismos na estabilização da matéria orgânica. Está associada à fração biodegradável dos componentes orgânicos carbonáceos; demanda química de oxigênio (DQO) que representa a quantidade de oxigênio requerida para estabilizar quimicamente a matéria orgânica carbonácea. E a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) última que representa o consumo total de oxigênio, ao final de vários dias, requerido pelos micro-organismos para a estabilização bioquímica da matéria orgânica. E a determinação indireta de carbono orgânico total (COT) que é uma medida direta da matéria orgânica carbonácea. É determinada através da conversão do carbono orgânico a gás carbônico. A matéria orgânica nitrogenada contempla as proteínas e os aminoácidos

que são biodegradados dando origem a compostos mais simples como amônia, nitrito, nitrato e nitrogênio molecular (GUIMARÃES, 2001).

c) Nitrogênio total

Inclui o nitrogênio orgânico, amônia, nitrito e nitrato. É um nutriente indispensável para o desenvolvimento dos micro-organismos no tratamento biológico. O nitrogênio orgânico e a amônia compreendem o denominado Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK). O Nitrogênio orgânico refere-se ao nitrogênio na forma de proteínas, aminoácidos e ureia. O nitrogênio na forma de amônia é produzido no primeiro estágio da decomposição do nitrogênio orgânico. O nitrito está relacionado ao estágio intermediário da oxidação da amônia, é praticamente ausente no esgoto bruto. O nitrato é o produto da oxidação da amônia e é praticamente ausente no esgoto bruto (GUIMARÃES, 2001).

d) Acidez e basicidade – valor de pH

É um indicador das características ácidas ou básicas do esgoto. Podendo ser reduzido pelos processos de oxidação biológica.

3.4. Parâmetros de Descarte

No intuito de realizar o despejo dos efluentes líquidos nos corpos hídricos de maneira correta, é necessária a verificação e a adequação dos parâmetros previstos na Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), pertencente ao Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. A Tabela 3.3 apresenta as condições adequadas para o lançamento de efluentes.

Tabela 3.3. Condições de lançamento de efluentes (BRASIL, 2011).

Parâmetro	Condição
pH	5 - 9
Temperatura	≤ 40°C ¹
Materiais sedimentáveis	Até 1 mL/L (1h em cone <i>Inmhoff</i>) ²
Vazão máxima	1,5 x a vazão média ³
Óleos e graxas	Óleos minerais até 20 mg/L Óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L
Materiais flutuantes	Ausentes
DBO ₅ à 20°C	Remoção mínima de 60%

¹Não podendo exceder a variação de 3 °C na zona de mistura. ²Lagos e lagoas com velocidade de circulação praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão ser ausentes. ³vazão média do período de atividade diário do agente poluidor.

A Tabela 3.4 apresenta a relação dos elementos pertencentes aos parâmetros inorgânicos e os respectivos valores de tolerância.

Tabela 3.4. Padrões de lançamento de efluentes parâmetros Inorgânicos (BRASIL, 2011).

Parâmetros Inorgânicos	Valores máximos (mg/L)
Arsênio total	0,5
Bário total	5,0
Boro total ¹	5,0
Cádmio total	0,2
Chumbo total	0,5
Cianeto total	1,0
Cianeto livre ²	0,2
Cobre dissolvido	1,0
Cromo hexavalente	0,1
Cromo trivalente	1,0
Estanho total	4,0
Ferro dissolvido	15,0
Fluoreto total	10,0
Manganês dissolvido	1,0
Mercurio total	0,01
Níquel total	2,0
Nitrogênio amoniacal total	20,0
Prata total	0,1
Selênio total	0,30
Sulfeto	1,0
Zinco total	5,0

¹Não se aplica para o lançamento de águas salinas; ²Destilável por ácidos fracos.

A Tabela 3.5, apresenta os elementos que constituem os parâmetros orgânicos e seus respectivos valores de tolerância.

Tabela 3.5. Padrões de lançamento de efluentes parâmetros orgânicos (BRASIL, 2011).

Parâmetros Orgânicos	Valores máximos (mg/L)
Benzeno	1,2
Clorofórmio	1,0
Dicloroetano ¹	1,0
Estireno	0,07
Etilbenzeno	0,84
Fenóis totais ²	0,5
Tetracloroeto de carbono	1,0
Tricloroetano	1,0
Tolueno	1,2
Xileno	1,6

¹Não se aplica para o lançamento de águas salinas; ²Destilável por ácidos fracos.

O automonitoramento para controle e acompanhamento periódico dos efluentes lançados nos corpos receptores é de responsabilidade da fonte poluidora dos recursos hídricos, tendo como base uma amostragem representativa dos mesmos (BRASIL, 2011).

3.5. Tecnologias para Remoção de Nitrogênio

3.5.1. Remoção lodos ativados

Esta tecnologia prevê um sistema que mantém a massa biológica em contato com a matéria orgânica do despejo líquido afluente, que deve estar em contínua circulação e na presença de oxigênio, fazendo com que esta massa cresça e flocule. Com a finalidade de manter esta condição de operação, é necessária uma alta oxigenação e disponibilidade de matéria orgânica biodegradável, proporcionando uma população microbiana ao sistema (VON SPERLING, 2002, TONETTI, 2013).

O sistema de lodos ativados é composto basicamente por: tanque(s) de aeração, aeradores, decantador(s) secundário e bomba(s) de recirculação, conforme mostrado na Figura 3.3 (ROCHA, 2016).

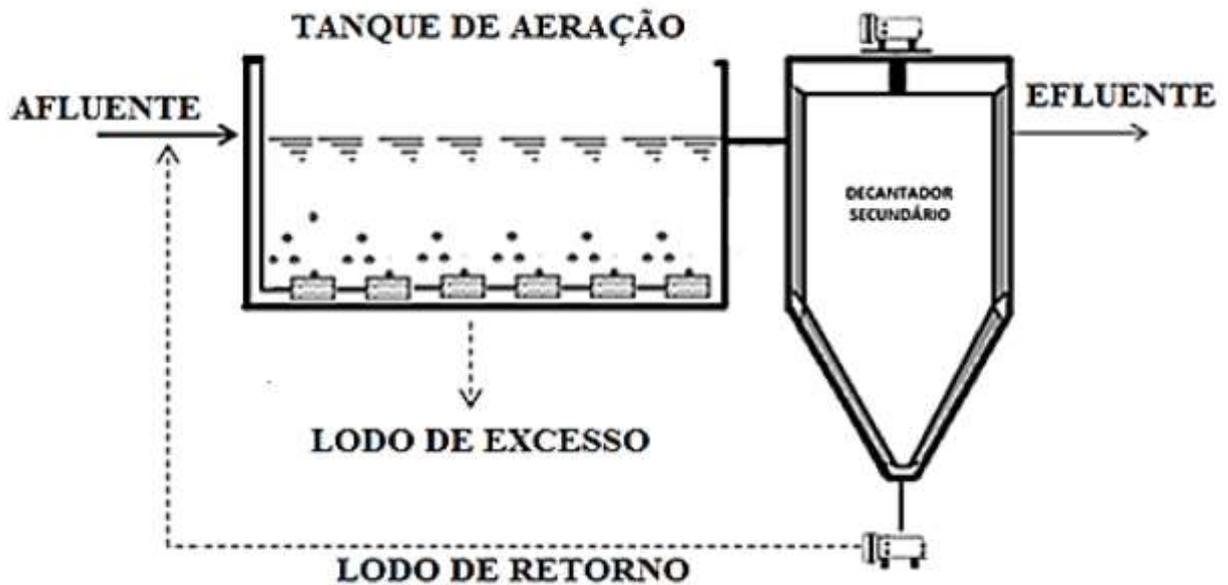


Figura 3.3. Esquema das unidades da etapa biológica do sistema de lodo ativado (ROCHA, 2016).

Os sistemas de lodos ativados podem ser associados aos processos como os de pré-desnitrificação e pós-desnitrificação, que auxiliam a redução biológica do nitrato. No caso da pré-nitrificação, o reator possui uma zona anóxica seguida pela aeróbia onde é conduzida a formação de nitratos, que são direcionadas a região anóxica através de uma recirculação interna. Entretanto, há uma dificuldade na aplicação desta técnica, devido ao grande volume de lodo recirculado que é requerido, que propicia um elevado gasto energético e conseqüentemente financeiro (BUENO, 2016).

Na etapa de pós-desnitrificação, o sistema é composto por um reator com zona aeróbia, zona anóxica e, opcionalmente uma zona aeróbia final. Na zona aeróbia, tem-se a remoção do carbono e a produção de nitratos que são formados na zona anóxica e sequencialmente reduzidos a nitrogênio gasoso. Porém, mesmo não havendo a necessidade de recirculação há uma desvantagem em relação a pré-desnitrificação, é que neste sistema o processo ocorre de maneira endógena e resulta em uma taxa de desnitrificação mais lenta (BUENO, 2016).

3.5.2. Remoção por meio de sistemas alagados (*Wetlands*)

Os sistemas alagados simulam os fenômenos (físicos, químicos e biológicos) que ocorrem espontaneamente na natureza, como os verificados nos brejos, em que

espécies vegetais purificam as águas. Este método de tratamento é efetivo na redução da matéria orgânica e na retenção ou eliminação de substâncias tóxicas que, de outra maneira, seriam lançadas no meio ambiente. Além da redução dos contaminantes, os sistemas de alagados construídos possuem comprovados resultados na remoção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo e são considerados uma opção econômica para o tratamento de águas residuais. Os sistemas artificiais, envolvem o crescimento de plantas em uma lagoa e o uso da luz solar para produzir oxigênio, que é utilizado por micro-organismos na quebra da matéria orgânica presente em águas residuais. Existem dois formatos de sistemas que são amplamente utilizados: *wetland* construído de fluxo de superfície de água livre (FWSCW) e *wetland* construído em fluxo subterrâneo (SSFCW). Entre os tipos de SSFCW existem dois: *wetland* construído em fluxo horizontal (HFCW) e *wetland* construído em fluxo vertical (VFCW). O emprego desta técnica possui vantagens, devido a simples construção, operação e manutenção, possuem alta robustez e estabilidade do processo, alta capacidade tampão para flutuações de carga hidráulica e orgânica e baixa produção de lodo. Também fornecem áreas verdes e melhoram a qualidade ambiental (UCKER, 2012; ILYAS, 2017).

3.5.3. Remoção por volatilização

O processo de volatilização é conhecido pela perda de amônia (NH_3) a partir do solo, que ocorre principalmente em função do ambiente químico. Com o aumento do pH, há um aumento na conversão de amônio à amônia, em que esta apresenta-se volátil e acaba sendo facilmente perdida para a atmosfera a partir do solo ou materiais orgânicos. Esta situação se deve ao fato de o processo de volatilização ser considerado um processo físico-químico reversível, que pode ser afetado pela temperatura, condições de luz, velocidade do vento e pelo valor do pH da água. Segundo os estudos de Zhang et al. (2016), que utilizaram este método no tratamento de resíduos oriundos da suinocultura, houve uma redução de aproximadamente 12% do N em águas residuárias de suinocultura (ZHANG, 2016; CASTRO, 2016).

3.5.4. Remoção por “*Stripping*”

A tecnologia do *air stripping* se baseia na transferência de compostos voláteis presentes no meio líquido para um gás de arraste (ar atmosférico). Sendo possível a

remoção de compostos orgânicos voláteis, amônia e gases odoríficos. O processo ocorre pela transferência da amônia do líquido para o ar podendo ser descrito pela Lei de Fick e sendo dependente da diferença de pressão parcial ou concentração da amônia entre o líquido e o ar.

A amônia é retirada na forma gasosa (nitrogênio na forma de amônia livre-não ionizada), enquanto o íon amônio é bastante solúvel em água. Desta forma, para que ocorra o processo do *air stripping* é necessário que o nitrogênio amoniacal total esteja sob forma de amônia, sendo dependente principalmente do pH e da temperatura (FILHO, 2015).

A remoção de amônia por *air stripping* tem sido aplicada em lixiviado de aterro sanitário, dejetos de suínos e bovinos, indústria de fertilizantes e curtume. Em muitos casos, é aplicada como etapa anterior ao tratamento biológico, com o objetivo de minimizar os efeitos de inibição, considerando o fato de a amônia atuar no crescimento de microrganismos nos processos biológicos de tratamento, ela pode ser prejudicial ao meio quando presente em concentrações elevadas, proporcionando a inibição da oxidação de nitrito ou até mesmo inibindo a oxidação do nitrogênio amoniacal total. (DELDUQUE, 2017).

3.5.5. Remoção por biodiscos

A remoção por biodiscos baseia-se em contadores biológicos rotativos que são chamados de reatores de disco, superfície, mídia e biofilme e fornecem uma alternativa ao processo de lodo ativado. O método de biodiscos possui uma base sólida que estimula o crescimento microbiano em um biofilme estático. O material é organizado por meio de uma série de placas ou discos que são girados em um eixo através de uma calha de biozona por motor ou acionamento a ar. A rotação leva a mistura de fluido a granel, a convecção através dos poros do meio / biofilme, a difusão do composto ao filme e subsequente troca de produto com o reator e os arredores. Sendo assim, processos biológicos ocorrem dentro do biofilme microbiano fixo, que contém componentes de biomassa ativa / não ativa, matriz extracelular de biofilme e detritos. Por este método temos a combinação do crescimento bacteriano e a utilização de substrato com um sistema natural de separação de biomassa. Porém, a

qualidade do efluente e a estabilidade do processo são dependentes de uma zona de sedimentação remota.

A aplicação dos processos de discos rotativos, já é conhecida quando se tem a necessidade de remover matéria orgânica das águas residuais. Teve a ampliação da sua aplicação a fim de possibilitar seu uso em processos de nitrificação e desnitrificação de águas residuais. Inúmeras investigações já foram feitas para examinar a relação entre carga hidráulica e orgânica, tempo de residência, concentração de efluentes e porcentagem remoção de nitrogênio (HASSARD, 2015).

Com base nisso e considerando as vantagens destes sistemas, os biodiscos rotativos são amplamente utilizados no tratamento biológico de efluentes em processos de nitrificação e desnitrificação e, também é empregado na diminuição de DQO e DBO (KARGI, 2002).

3.5.6. Remoção por processos bioeletroquímicos

A bioeletroquímica compreende uma variedade de atividades de pesquisa, nas quais sistemas biológicos são investigados ou explorados por meios eletroquímicos. Essas atividades incluem estudos fundamentais sobre fenômenos relacionados à transferência de elétrons em biologia e aplicações como biossensores eletroquímicos e células de biocombustível (KLOKE, 2010).

Nos processos convencionais de desnitrificação biológica ocorre uma reação de óxido-redução, em que o nitrato é reduzido a N_2 gasoso. Enquanto no processo de desnitrificação bioeletroquímica, além da reação de óxido-redução por micro-organismos, tem-se alguns pontos que diferem tais métodos como: a velocidade de remoção de nitrato, que se apresenta mais lenta nos processos convencionais do que nos sistemas bioeletroquímicos, assim como possibilidade de aproveitamento energético e da amônia. A velocidade de remoção do nitrato é elevada quando comparada a desnitrificação convencional, há uma possibilidade de aproveitamento de amônia nos processos bioeletroquímicos assim como um possível aproveitamento energético.

O processo bioeletroquímico ocorre em duas câmaras (uma anódica e outra catódica) com diferenças de potenciais elétricos, em que os micro-organismos

presentes na câmara anódica oxidam os substratos orgânicos produzindo elétrons que são transportados para a câmara catódica, onde ocorrerá a redução do nitrato pelo consumo dos elétrons disponibilizados (NAKAGAMA, 2017).

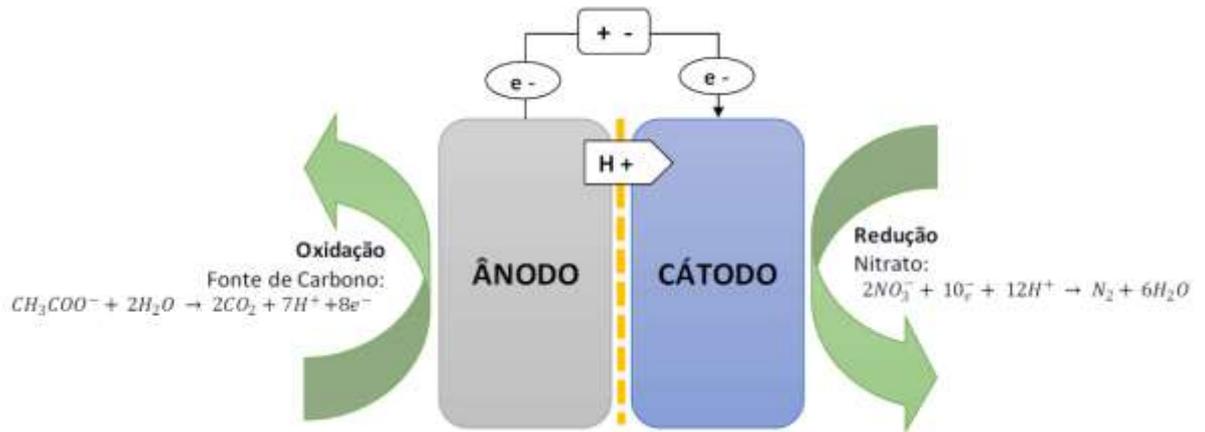


Figura 3.4. Ilustração de um sistema bioeletroquímico (NAKAGAMA, 2017).

3.5.7. Remoção através de biorreatores de membranas

Os biorreatores de membrana (MBR) são considerados uma tecnologia mais recente para o tratamento de águas residuais contendo micropoluentes e que podem ser adaptados com base no volume de água que se necessita tratar.

A utilização de MBR proporciona uma maior eficiência no tratamento de poluentes, quando comparada a outros sistemas biológicos. Isso se deve, ao fato da existência de uma população microbiana muito alta na vizinhança imediata da superfície da membrana, garantindo a remoção completa do poluente antes que a água residual seja filtrada através da membrana. Além disso, devido ao efeito de peneiramento da membrana, os poluentes com peso molecular superior ao peso molecular das membranas são retidos, colocando-a em contato com os microorganismos degradadores no interior do MBR para sua completa degradação (GOSWAMI, 2018).

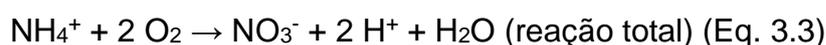
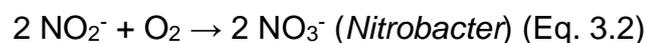
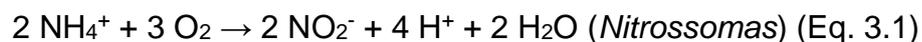
O biorreator de membrana (MBR) está se tornando uma tecnologia privilegiada e viável para a reutilização de águas residuais levando a uma reutilização irrestrita, conforme comprovado no Oriente Médio. A aplicação no tratamento de efluentes se deve à sua pequena área de cobertura e à capacidade de produzir efluentes de alta qualidade. No que diz respeito a remoção de boa parte nitrogênio orgânico dissolvido

biodisponível (ABDON), responsável por propagar o crescimento de algas, este método proporciona a redução deste parâmetro e possibilita uma amenização no impacto de descarte do efluente nos corpos receptores. Avaliações do potencial de MBR para remoção de nitrogênio orgânico dissolvido (DON) demonstram um desempenho superior ao processo de tratamento biológico convencional de águas residuais, quando consideradas as condições em termos de melhor nitrificação e captura de sólidos e de matéria orgânica coloidal. Entretanto, deve se levar em conta as condições relacionadas ao tempo de retenção de sólidos do efluente (SRT), onde SRT maiores proporciona melhores resultados de redução da concentração quanto de NT quando comparado a condições de SRT menores (HU, 2019; KIM, 2010; SUN, 2013).

3.5.8. Remoção por nitrificação

O processo de nitrificação baseia-se na oxidação biológica do nitrogênio amoniacal por parte das bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e bactérias oxidadoras de nitrito (NOB). Esse grupo de bactérias tem como característica obter sua energia para crescimento a partir da oxidação de compostos inorgânicos (NH_4^+ e NO_2^-), utilizando o carbono inorgânico (CO_2) como fonte de carbono e o oxigênio (O_2) como acceptor de elétrons. As AOB oxidam o amônio a nitrito, sendo que nesta classe de bactérias podemos encontrar gêneros como: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira*, sendo que as mais estudadas são as *Nitrosomonas*. As NOB são responsáveis por oxidar o nitrito a nitrato e, dentro desse grupo, se encontram os gêneros: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus*; sendo as mais estudadas as *Nitrobacter* (ZOPPAS, 2016).

As equações 3.1 - 3.3 ilustram o processo das transformações do amônio em nitrito e, sequencialmente, a nitrato (BAUR, 2012):



3.5.9. Remoção por desnitrificação

O processo de desnitrificação consiste na transformação do nitrogênio oxidado (nitrato) em nitrogênio gasoso. Este mecanismo envolve a formação de vários produtos intermediários como o nitrito, o óxido nítrico e o óxido nitroso sendo considerada a principal maneira pelo qual o N_2 é formado biologicamente. Este processo se deve a ação de bactérias capazes de desnitrificar. Bactérias desnitrificantes são comuns entre as classes alfa e beta Gram-negativas das *Proteobactérias*, como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*, algumas bactérias Gram-positivas (como *Bacillus*) e algumas arqueias halofílicas (como *Halobacterium*). Estes organismos são quimiotróficos, incapazes de utilizar a energia radiante, de maneira a dependerem da oxidação de compostos químicos para obterem energia. Quando estes organismos são submetidos a ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio molecular eles empreguem o nitrato e outras formas de nitrogênio como receptores de elétrons para a efetivação do seu processo de respiração além disso utilizam fontes de carbono orgânico como doador de elétrons tanto para a realização do processo de respiração quanto para o crescimento de microrganismos. Na Figura 3.5 é mostrado os possíveis produtos formados no processo de desnitrificação (ATKINS, 2001; AHN, 2006; LIU, 2017; MADIGAN, 2016).

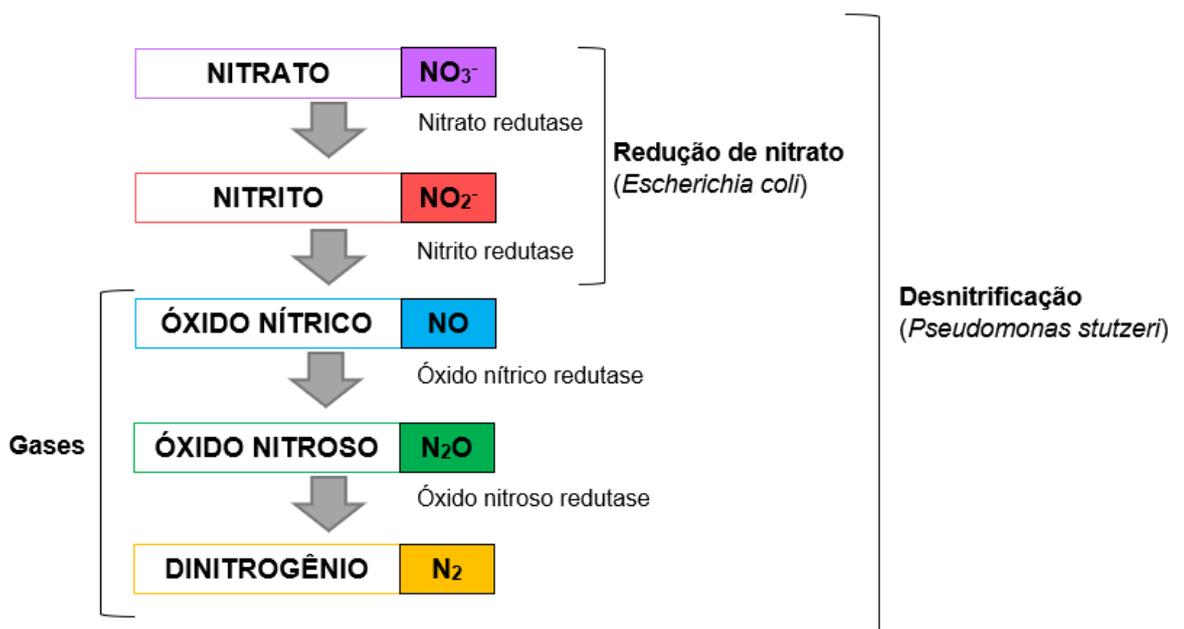


Figura 3.5. Produtos oriundos da reação de desnitrificação MADIGAN, 2016).

Além disso, necessitam de substâncias nutrientes que participam do metabolismo celular como os macronutrientes (carbono, nitrogênio, hidrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, sódio e ferro) e os micronutrientes (cobalto, zinco, molibdênio, cobre, manganês e níquel). Segundo Kim et al. (2010), íons metálicos como Ca^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+} , são capazes de influenciar o crescimento bacteriano assim como a remoção de NH_4^+ . Os íons Mn^{2+} e Mo^{2+} apresentaram significância apenas no crescimento bacteriano, enquanto os íons Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} não mostraram efeitos no crescimento e nem na remoção de amônia. Esses fenômenos podem ser explicados pelo fato de que os íons metálicos estão envolvidos na catálise enzimática de várias maneiras e os metais vestigiais Mo^{2+} e Fe^{2+} são encontrados no óxido nítrico redutase (KIM, 2005).

O crescimento bacteriano também pode sofrer interferências negativas durante a desnitrificação, devido a alguns fatores limitantes como: temperatura, pH, disponibilidade de O_2 , quantidade e a qualidade da água e a disponibilidade das fontes de carbono.

Existem faixas de temperatura diferentes e que resultam melhores condições para o crescimento das bactérias desnitrificantes, estas diferenças estão relacionadas as peculiaridades de cada família ou espécie. Cada bactéria possui três temperaturas importantes, a saber: temperatura mínima, temperatura ótima e temperatura máxima. A temperatura mínima é definida como a menor temperatura que a bactéria precisa para crescer, a temperatura ótima relaciona-se a condição que a bactéria terá o melhor desempenho de crescimento e a última que é a temperatura máxima é aquela na qual as enzimas são danificadas pelo calor e a célula para de crescer (VIEIRA, 2012).

O pH é um dos principais parâmetros de controle da desnitrificação, este pode variar no sistema devido aos resultados dos processos microbianos dos constituintes. Normalmente, o pH ótimo é bem definido para cada espécie e a maioria das bactérias não cresce em valores de pH acima ou abaixo de seu pH ótimo. No estudo conduzido por YANG, et. al. (2019) o pH é destacado como um fator chave que afeta o processo de remoção de nitrogênio. As bactérias responsáveis pelo processo de desnitrificação aeróbia preferem condições neutras ou alcalinas, de tal forma que tanto a nitrificação quanto a desnitrificação podem ser fortemente inibidas em pH inferior a 6.

A desnitrificação é geralmente realizada por um processo de bioconversão heterotrófica sob condições anaeróbias. Os micro-organismos heterotróficos utilizam nitrito e/ou nitrato ao invés de oxigênio como aceitadores de elétrons, a matéria orgânica como fonte de carbono e energia para converterem as formas oxidadas do nitrogênio em di-nitrogênio gasoso. Fontes de carbono contemplando orgânicos biodegradáveis são amplamente utilizados como doadores de elétrons; exemplos incluem metanol, ácidos orgânicos, acetato, glicose e etanol (AHN, 2006; MIAO, 2019).

Segundo Yu et. al. (2019), que empregaram a técnica de desnitrificação para a remoção de nitrogênio em águas residuais pelo uso de *wetlands*, a baixa relação entre fontes de carbono e nitrogênio resultam em uma menor eficiência do sistema de remoção do nitrogênio total, podendo ser considerado um fator limitante de sucesso deste método.

As bactérias desnitrificantes *Bacillus sp.* são probióticos importantes, amplamente utilizados na indústria da aquicultura para melhorar a qualidade da água, promover o crescimento e prevenir doenças, podendo destacar a *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans* (SONG, 2011).

Todas as bactérias formadoras de endósporos são espécies gram-positivas pertencentes a ordem *Bacillales*. As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são aeróbias ou anaeróbias facultativas e são diferenciadas com base na morfologia celular, forma e posição dos endósporos dentro da célula, relação com O₂ e o metabolismo energético. Estes organismos podem ser seletivamente isolados do solo, alimentos, poeira e outros materiais, pela exposição da amostra a 80°C por 10 minutos, um tratamento que efetivamente mata as células vegetativas, enquanto os endósporos presentes permanecem viáveis. Apresentam bom crescimento em meios definidos, contendo qualquer uma das fontes possíveis de carbono. Isso ocorre devido a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares que clivam polímeros complexos, como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos permitindo aos organismos utilizarem esses produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons (MADIGAN, 2016).

As bactérias do gênero *Bacillus sp.* demonstram capacidade de nitrificar e desnitrificar sendo consideradas atrativas candidatas à aplicação na remoção de nitrogênio amoniacal das águas residuais. As cepas de *Bacillus subtilis* foram capazes de converter a amônia em N_2 , sem a formação de óxido nitroso em condições aeróbias. No estudo conduzido por Kim et al. (2005) foi observado que durante o processo de remoção de amônia, as cepas heterotróficas de *Bacillus* apresentaram vias metabólicas menos complexas que as autotróficas. Com isso foi possível notar que o processo de remoção usando as cepas de *Bacillus* demonstravam algumas vantagens econômicas, e o desenvolvimento desse processo de desnitrificação aeróbica pode servir como uma alternativa aos custosos processos de nitrificação-desnitrificação.

Segundo Yang et al. (2011) a *Bacillus subtilis* demonstrou a capacidade em usar amônio e carbono para assimilação e desnitrificação. Durante 120 h de crescimento autotrófico na presença de $104,12 \pm 1,27$ mg/L de NH_4^+ após o balanço de nitrogênio $20,4 \pm 2,7\%$ dos NH_4^+ foi removido como nitrogênio gasoso. O meio cultivado com a adição de sal de acetato (razão C/N de 6) foi responsável por remover $58,4 \pm 4,3\%$ do NH_4^+ durante 60 h de crescimento. A capacidade heterotrófica de nitrificação / desnitrificação aeróbica foi de aproximadamente o dobro de outras espécies de *Bacillus*. Um sistema aberto inoculado com a *Bacillus subtilis*, foi empregado para tratar águas residuais urbanas de alta resistência e mostrou potencial para aplicação industrial (YANG et al., 2011).

Na remoção de nitrogênio total o uso de diferentes fontes de carbono, como acetato, glicose, citrato e succinato não mostra diferenças significativas e não afetam parâmetros importantes como a eficiência da desnitrificação aeróbica. Todas as quatro fontes de carbono são fontes externas adicionadas ao meio e adequadas de carbono, com base nos resultados experimentais. Os dados desta pesquisa sugerem que a bactéria em questão possui uma alta capacidade de remoção de nitrogênio em condições aeróbias na presença de carbono orgânico e converte o amônio durante a fase de crescimento através do uso de acetato na proporção de acetato/nitrogênio total de 6 como ideal para obter desnitrificação econômica com acúmulo mínimo de nitrito e amônio (YANG et al., 2011)

3.5.10. Remoção por nitrificação e desnitrificação simultânea

A metodologia de remoção de nitrogênio *via* nitrificação e desnitrificação simultânea foi proposta a mais de 40 anos, após a observação deste fenômeno durante a lixiviação de água dos solos. O emprego desta técnica nos tratamento de águas residuais, devido à presença das comunidades microbianas que realizam a nitrificação e a desnitrificação em um mesmo reator, leva a uma redução de custos pela eliminação da etapa de reciclagem de lodo . Este mecanismo apresenta grande sucesso devido ao fato das bactérias nitrificantes e desnitrificantes serem capazes de coexistir ao longo de um gradiente de oxigênio em estruturas semelhantes a biofilmes ou em baixos níveis de oxigênio dissolvido (CHAI, 2019).

Segundo o estudo conduzido por Zhao et al. (2017), o processo de nitrificação demonstrou-se viável e altamente eficiente, quando considerada a nitrificação aeróbica durante o tratamento de águas poluídas, entretanto gera facilmente o acúmulo de nitratos. No caso específico das águas contaminadas com nitrogênio, a baixa eficiência de desnitrificação é um grande desafio para que se possa alcançar a eficiência de nitrificação e desnitrificação simultânea (SND) devido à sua baixa relação carbono / nitrogênio. Neste sentido, a adição de fontes externas de carbono tem sido levada em conta, nos últimos anos, especialmente materiais lignocelulósicos naturais foram amplamente utilizados pelas suas vantagens como o baixo custo, a abundância e eficiência (ZHAO et al., 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são descritos todos os procedimentos usados neste estudo, como o cultivo da *Bacillus subtilis*, a preparação dos meios sintéticos nitrificante e desnitrificante, a descrição da situação de contato entre a *Bacillus subtilis* e os meios sintéticos nitrificante e o meio sintético desnitrificante com alta carga de nitrogênio, assim como os testes realizados para acompanhamento da situação de contato entre a *Bacillus subtilis* e o meios sintéticos. Além disso, também serão informados os testes de caracterização em relação ao estudo preliminar com uma amostra de efluente industrial (advindo de uma indústria de eletrônicos) com alta carga de nitrogênio, onde este foi analisado para avaliação da viabilidade de tratamento pela aplicação da *Bacillus subtilis* para redução da carga nitrogenada.

4.1. Materiais

Os reagentes e materiais utilizados foram obtidos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia (Quadro 4.1).

Quadro 4.1. Lista de reagentes (elaborado pelo autor).

Materiais e Reagente	Pureza	Marca
Ácido bórico	99,50%	Vetec
Ácido nítrico	65,00%	Moderna
Ácido salicílico	99,00%	Êxodo
Ácido succínico	99,50%	Merck
Ácido sulfúrico	95,00%	Panreac
Ágar	Não fornecida	Vetec
Amido	99,60%	Synth
Azul de metileno	Não fornecida	Merck
Biftalato de potássio	99,50%	Dinâmica
Cloreto de cálcio	96,00%	Nuclear
Cloreto de cobalto hexa-hidratado	99,00%	Merck
Cloreto de mangânes tetra-hidratado	98,00%	Synth
Cloreto de sódio	99,00%	Nuclear
Dicromato de potássio	99,00%	Nuclear
Diidrogênio fosfato de potássio	98,00%	Nuclear
EDTA	99,00%	Reagen
Etanol	99,50%	Merck
Extrato de levedura	Não fornecida	Vetec
Fosfato de magnésio heptahidratado	Não fornecida	Vetec
Glicose	99,90%	Synth
Hidrogeno fosfato dissódico	99,90%	Vetec
Hidróxido de sódio	97,00%	Synth
Iodeto de sódio	99,50%	Vetec
Meio Luria Bertani (LB)	Não fornecida	Kasvi
Molibdato de amônio tetra-hidratado	99,00%	Merck
Nitrato de sódio	99%	Êxodo
Óxido de magnésio	97,00%	Merck
Peptona	Não fornecida	Merck
Sulfato de amônia	99,00%	Synth
Sulfato de cobre penta-hidratado	98,00%	Dinâmica
Sulfato de ferro heptahidratado	99,00%	Synth
Sulfato de manganês	98,00%	Synth
Sulfato de prata	98,00%	Nuclear
Sulfato de zinco heptahidratado	99,00%	Synth
Tiosulfato de sódio	99,50%	Vetec
Vermelho de metila	Não fornecida	Nuclear

4.2. Cultivo das bactérias

Cepa de *Bacillus subtilis* foi colocada em solução salina e a seguir cultivada em caldo Luria Bertani (LB) para sequencial adição ao contato com os meios sintéticos, contendo (por litro): triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 g. Sendo mantidas 8 h a 37 °C, 200 rpm em caldo LB, e as suspensões bacterianas foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 min e lavadas com solução salina por três vezes.

4.3. Preparo de meios sintético – meio nitrificante e meio desnitrificante

Foram preparados meios sintéticos para a validação das condições de crescimento de *Bacillus subtilis*. Para isso, foram utilizados dois meios de análise, um meio com substratos e caráter nitrificante e outro com caráter desnitrificante, conforme os estudos de Yang et. al., 2020.

a) Meio de nitrificação (MN) foi utilizado para a determinação da capacidade de remoção de amônio pelo uso de cepa de *Bacillus subtilis*, contendo (por litro): 0,71 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,0 g de Na_2HPO_4 , 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,65 g de glicose, 2 mL de solução de oligoelementos, a solução teve seu pH ajustado para faixa entre 7,0-7,5.

b) Meio de desnitrificação (MD) foi usado para a determinação da capacidade de remoção de nitrato ou nitrito pelo uso de cepa de *Bacillus subtilis*, contendo (por litro): 0,84 g de NaNO_3 , 4,0 g de Na_2HPO_4 , 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,65 g de glicose, 2 mL de solução de oligoelementos, a solução teve seu pH ajustado para faixa entre 7,0-7,5.

c) A solução de oligoelementos foi preparada a fim de conter (por litro) os seguintes componentes: 50 g de EDTA, 3,92 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,5 g de CaCl_2 , 5,06 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5,0 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,1 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,57 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1,61 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

4.4. Contato entre cepa de *Bacillus subtilis* e o meio sintético nitrificante e meio sintético desnitrificante com alta carga nitrogenada

Para a avaliação do crescimento da *Bacillus subtilis*, foram elaborados sistemas de contato contendo 4 variações de amostras. Para acompanhamento do desenvolvimento das bactérias, tanto os meios de estudo quanto os materiais utilizados foram esterilizados, e todo manuseio realizado dentro das condições de controle de contaminações biológicas, como o uso do álcool para limpeza das bancadas assim como o tratamento das amostras, sendo feita próxima ao fogo.

As amostras foram mantidas em uma incubadora (modelo incubadora 430, Nova ética), a 150 rpm à 37 °C pelo período de 5 dias (120h). As bactérias foram colocadas em contato com soluções sintéticas contendo características desnitrificantes ou nitrificantes, e para cada uma das situações foram preparados meios de controle, contendo apenas as condições do meio sem a presença da bactéria. No Quadro 4.2 a seguir tem-se a descrição das amostras e suas respectivas composições.

Quadro 4.2. Relação das amostras de avaliação das bactérias (elaborado pelo autor).

Nome da amostra	Composição da amostra
Branco MD	Meio Desnitrificante
Amostra MD	Meio Desnitrificante + Bactéria
Branco MN	Meio Nitrificante
Amostra MN	Meio Nitrificante + Bactéria

O teste foi conduzido em triplicatas, sendo que durante o período de teste foram coletadas alíquotas diárias para acompanhamento do estudo. Foram realizadas determinações de densidade óptica, pH, concentração de nitrato e as identificações dos ânions sulfato, fluoreto, fosfato e cloreto. As técnicas utilizadas para estas determinações serão descritas a seguir. A Figura 4.1, apresenta uma imagem das amostras acomodadas em uma incubadora durante o momento de teste.



Figura 4.1. Incubadora contendo as amostras para avaliação (elaborada pelo autor).

4.4.1. Determinação de nitrato

a) Método potenciômetro: Eletrodo íon seletivo de nitrato

O método baseia-se no uso de uma membrana permeável de gás para separar a amostra de uma solução de cloreto de amônio que fica na parte interna do eletrodo. A amônia é dissolvida e convertida em $\text{NO}_3^-_{(\text{aq})}$ difundindo-se através da membrana e alterando o pH da solução interna que é detectado por um eletrodo de pH. O nível fixo de cloreto na solução interna é detectado por um eletrodo íon-seletivo de cloreto que serve como eletrodo de referência.

Para a análise foi utilizado equipamento Labquest com interface direta de correlação da concentração de nitrato entre o eletrodo íon seletivo e as amostras.

b) Cromatografia iônica

A análise de cromatografia iônica possibilita a determinação sequencial de fluoreto, cloreto, nitrito, orto-fosfato, brometo, nitrato e íons sulfato em amostras aquosas por cromatografia de íons suprimidos. A utilização de uma curva padrão do elemento de interesse, assim como a preparação de curvas analíticas para cada ânion de interesse por meio de uma relação gráfica, entre altura ou área do pico *versus* a concentração nominal da solução padrão de ânions, possibilita a identificação direta na concentração da amostra. As amostras foram diluídas para ajuste em relação à curva padrão do método, e injetadas alíquotas da amostra em um cromatógrafo de íons. Os íons nitrato foram identificados com base em seus tempos de retenção em comparação com padrões conhecidos. A quantificação é realizada medindo a altura ou área do pico e comparando-a com uma curva de calibração gerado a partir de padrões conhecidos.

4.4.2. Determinação de amônia – Método potenciômetro: Eletrodo íon seletivo de amônia

O método baseia-se no uso de uma membrana permeável de gás para separar a amostra de uma solução de cloreto de amônio que fica na parte interna do eletrodo. A amônia é dissolvida e convertida em $\text{NH}_3(\text{aq})$ difundindo-se através da membrana e alterando o pH da solução interna que é detectado por um eletrodo de pH. O nível fixo de cloreto na solução interna é detectado por um eletrodo íon-seletivo de cloreto que serve como eletrodo de referência.

Para a análise foi utilizado equipamento Labquest com interface direta de correlação da concentração de nitrato entre o eletrodo íon seletivo e as amostras.

4.4.3. Determinação de pH

Para a determinação do pH foram feitas as leituras das amostras à 25°C (± 2 °C), com o auxílio de um pHmetro digital (Digimed DM-20) calibrado utilizando os padrões comerciais pH 4,00 e pH 7,00.

4.4.4. Determinação de Densidade Óptica (DO)

A análise de densidade óptica das amostras foi realizada diariamente durante o teste de contato, pela leitura direta em espectrofotômetro (Laboratório Thermo Fisher Scientific – UV-VIS) no comprimento de onda de 600 nm, os meios de contato desnitrificante e nitrificante foram utilizados como branco na leitura das amostras e dos controles.

4.4.5. Teste de Gram

Para o teste de Gram, foram coletados 10 µL de amostra e colocados em uma lâmina de vidro, a placa foi seca em bico de Bunsen para fixação da amostra. O material foi corado com cristal de violeta pelo contato durante 60 segundos, logo a lâmina foi lavada com água destilada, e a ela foi adicionado lugol mantendo-o por 60 segundos, o ciclo de lavagem foi repetido, a lâmina foi descorada pelo uso de álcool-acetona, com contato por mais 30 segundos, e por último após nova lavagem com água destilada foi adicionada safranina, mantendo-a na lâmina por 30 segundos. Após a adição do último corante, a lâmina foi lavada uma última vez, seca e levada para a análise em um microscópio (VIEIRA, 2012).

4.5. Coleta das amostras reais

As amostras reais, classificadas como efluentes industriais, foram coletadas em uma indústria do ramo eletroeletrônico situada na cidade de Gravataí-RS. As amostras foram coletas em três pontos diferentes; chegada do efluente industrial ao tanque de tratamento – efluente bruto, amostra pré-tratada proveniente do tanque de equalização após a dosagem do floculante e a terceira amostra referente a lagoa de estabilização após o processo de tratamento completo. A análise das diferentes amostras possibilita identificar a situação do tratamento em relação a eficiência do tratamento empregado pela empresa em relação a redução da carga nitrogenada, assim como possibilita a identificação do local de coleta.

4.6. Caracterização das amostras reais

Para as análises de caracterização é necessário que as amostras sejam previamente filtradas, a fim de remover materiais particulados que possam prejudicar os equipamentos durante os testes ou gerar interferências nos resultados obtidos. Para a preservação das amostras, estas foram armazenadas em galões e mantidas em geladeira à 4 °C até o momento de realização dos testes.

4.6.1. Determinação de amônia – Método Kjeldahl

A determinação de nitrogênio amoniacal foi realizada através do método Kjeldahl, conforme o procedimento indicado no manual do próprio destilador Kjeldahl, modelo 130A da VELP *Scientific* (Figura 4.1) (CHAI, 2019). O método indicado para análise de efluentes líquidos não requer a etapa de digestão da matéria orgânica, uma vez que o nitrogênio amoniacal corresponde ao nitrogênio inorgânico, possibilitando que seja realizada a destilação direta.



Figura 4.5. Destilador Kjeldahl.

Em um procedimento típico de destilação usando o destilador Kjeldahl foram adicionados entre 5 e 20 mL da amostra de efluente no tubo digestor e 1,2 g de óxido de magnésio (com a finalidade de tornar o pH favorável para a evaporação da amônia). No Erlenmeyer foram adicionados 25 mL de solução de ácido bórico 4% (m/v) e 10 gotas de indicador de Tashiro - vermelho de metila e azul de metileno em relação de 2:1 em etanol. Ao final da etapa de destilação, o conteúdo do Erlenmeyer

foi titulado com solução padronizada de H_2SO_4 0,1M até o ponto de viragem, indicado pela mudança de cor do indicador de verde esmeralda para cinza. O volume de ácido sulfúrico gasto e o volume de amostra foram utilizados nos cálculos de quantificação do nitrogênio amoniacal conforme a equação que descreve a fórmula de cálculo (Equação 4.1).

$$\% \text{ Nitrogênio amoniacal} = \frac{V_{H_2SO_4} (mL) * C_{real H_2SO_4} \left(\frac{mol}{L}\right) * \frac{2,8014mg}{mL}}{0,1 \left(\frac{mol}{L}\right) * m_{amostra} (mg)} * 100\% \quad (\text{Eq. 4.1})$$

4.6.2. Determinação de oxigênio dissolvido - Método de *Winkler* modificada com azida sódica

A metodologia utilizada baseia-se na adição de uma solução de manganês divalente, seguida da adição de um álcali forte, à amostra colocada em frasco de vidro com volume definido, com tampa esmerilhada e biselada. O oxigênio dissolvido oxida rapidamente uma quantidade equivalente do precipitado de hidróxido manganoso divalente disperso a hidróxido de estado de valência maior. Na presença de íons iodeto e em meio ácido, o manganês oxidado reverte ao estado divalente com a liberação de iodo equivalente ao conteúdo original de oxigênio dissolvido. O iodo é então titulado com uma solução padrão de tiosulfato. O ponto final da reação pode ser visualizado com indicador de amido. Modificações no método como a adição de azida sódica elimina as interferências causadas pela presença do grupo NO_2^- .

Inicialmente foram medidos os parâmetros de pH e temperatura das amostras, na sequência os frascos de DBO foram completamente preenchidos, evitando a formação de bolhas, sendo acrescentados a eles 2 mL de solução de sulfato manganoso e 2 mL de solução de soda iodeto azida, os frascos foram devidamente fechados e homogeneizados por inversão. Após a sedimentação do precipitado foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, e realizada nova homogeneização por inversão até dissolução completa do precipitado. Sequencialmente, foram adicionados 200 mL a um Erlenmeyer e realizada a titulação com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,025 M até a coloração amarelo claro. Foi adicionado a amostra 1 mL de solução de amido, resultando em uma coloração azulada, continuando o processo de titulação até o desaparecimento da coloração azul. Para o cálculo do DBO utilizando-

se o tiosulfato 0,025 M e titulando-se 100 mL de amostra foi considerada a Equação 4.2, demonstrada a seguir.

$$OD \text{ (mg / L } O_2) = \frac{MNa_2S_2O_3 \times VNa_2S_2O_3 \times 8.000}{V_{AMOSTRA}} \quad (\text{Eq. 4.2}).$$

4.6.3. Determinação Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A demanda bioquímica de oxigênio representa a quantidade de oxigênio requerida pelos microrganismos (principalmente bactérias) para estabilizar a matéria orgânica biodegradável em condições aeróbicas. O método é considerado empírico, pois apesar de trabalhar sob condições padronizadas, ele não representa os processos que ocorrem na natureza, como luminosidade e movimentação das águas. Além disso, existem vários outros fatores que interferem como o crescimento dos microrganismos, a taxa de consumo de oxigênio, o grau de nitrificação etc. desta forma tais condições devem ser controladas para a devida aplicação da metodologia.

O método consiste na incubação da amostra por cinco dias à temperatura de 20 °C ao abrigo de luz. Ao iniciar o teste preparam-se dois frascos com amostra exatamente da mesma maneira. Em um dos frascos determina-se o oxigênio dissolvido inicial. O outro frasco é incubado e após cinco dias faz-se a medida do oxigênio dissolvido. A DBO é computada como a diferença entre o teor de oxigênio dissolvido inicial e final, o que corresponde ao consumo de oxigênio para oxidação biológica da matéria orgânica e de materiais inorgânicos presentes na amostra. A determinação do oxigênio dissolvido na amostra, antes e após a incubação, é feita pelo método de *Winkler* modificado pela azida sódica. O tempo de incubação é influenciado pela quantidade e tipo de matéria orgânica a ser oxidada, o tempo de incubação é padronizado em 5 dias, sendo este o tempo necessário para mineralizar 80% da matéria orgânica carbonácea e iniciar o processo de nitrificação. A demanda de oxigênio em um corpo d'água ocorre devido à presença de matéria orgânica carbonácea, usada como alimento para os microrganismos aeróbicos. A ocorrência de nitrogênio oxidável (nitrito, amônia e nitrogênio orgânico), utilizado como fonte de nutriente por certas bactérias, além do consumo por alguns compostos químicos redutores, como ferro ferroso, sulfato e sulfito, os quais reagem com o oxigênio

dissolvido. O método da incubação com diluição aplica-se a águas superficiais poluídas, efluentes e águas residuárias que possuem organismos próprios, porém não apresentem oxigênio suficiente para que, após 5 dias de incubação, ainda haja oxigênio dissolvido na amostra.

As amostras líquidas foram previamente tratadas a fim de evitar possíveis erros na análise. Para isso, as amostras foram condicionadas à temperatura de 20 ± 1 °C e ajustado o pH entre 6,5 e 7,5, por meio de soluções de H_2SO_4 ou $NaOH$ de tal maneira que o acréscimo do neutralizante não proporcionasse uma diluição da amostra maior do que 0,5%.

Foram preparadas diluições 5, 10, 25, 50 e 100 % da amostra, pela adição parcial de água de diluição, sequencialmente foram adicionadas alíquotas de amostra a fim de obter as diluições desejadas. Foram transferidas quantidades iguais, por sifonamento, para 2 frascos de DBO enchendo-os até que transbordassem. Foi determinada a concentração do oxigênio dissolvido (OD_i) de um dos frascos, o outro frasco foi incubado com selo hidráulico a 20 °C, no escuro, por 5 dias, para a determinação da concentração do oxigênio dissolvido (OD_5). O cálculo de quantificação foi realizado utilizando a Equação 4.4 a seguir:

$$DBO (mg O_2 L^{-1}) = x = \frac{OD_i - OD_5}{P} \times 100$$

Onde:

OD_i = Oxigênio dissolvido inicial da amostra ($mg O_2 / L$)

OD_5 = Oxigênio dissolvido após 5 dias de incubação a 20 °C ($mg O_2 / L$)

P = Porcentagem de diluição da amostra

4.6.4. Determinação Química de Oxigênio (DQO)

Na análise da DQO, o oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica contida na água e possível de ser oxidada, é medido utilizando-se um composto fortemente oxidante como, por exemplo, o dicromato de potássio em meio fortemente ácido, oxidando até mesmo a matéria orgânica mais resistente à oxidação, convertendo-a em dióxido de carbono e água. Durante o processo de oxidação

química, quaisquer sais inorgânicos presentes são também convertidos para as formas oxidadas.

Desta forma, a DQO indica a quantidade de oxigênio que seria consumido através de reações químicas de oxidação de diversos compostos orgânicos presentes, sem a intervenção de microrganismos, indicando de maneira indireta a quantidade de matéria orgânica presente no líquido.

As amostras para esta análise devem estar bem homogêneas, principalmente aquelas que contenham muitos sólidos sedimentáveis, como o caso dos esgotos, tornando necessária uma cuidadosa homogeneização antes de se tomar a alíquota adequada para análise.

Para a análise de DQO, foram utilizados tubos lavados com H₂SO₄ 20% para eliminação de interferências. A seguir foram adicionados 1,5 mL da solução de digestão, 2,5 mL de amostra de água residuária e 3,5 mL de reagente ácido sulfúrico. Os tubos foram fechados e homogeneizados e colocados em um bloco digestor para fazer a digestão da amostra a 150 °C por 2 horas. Após o procedimento de digestão as amostras foram colocadas em repouso para resfriamento, nova homogeneização e deixadas para sedimentação. Para identificação dos resultados, as amostras foram lidas no comprimento de onda de 600 nm ($\lambda = 600 \text{ nm}$) em espectrofotômetro (UV-VIS Hewlett Packard-8453) utilizando curva de calibração previamente preparada e considerando os seguintes pontos; 0 mg O₂/L (Branco), 50 mg O₂/L, 100 mg O₂/L, 200 mg O₂/L, 300 mg O₂/L, 400 mg O₂/L, 500 mg O₂/L

O valor obtido no espectrofotômetro corresponde a concentração em mg O₂/L de DQO.

4.6.5. Determinação de pH

Para a determinação do pH foram feitas as leituras das amostras à 25°C (± 2 °C), com o auxílio de um pHmetro digital (Digimed DM-20) calibrado utilizando os padrões comerciais pH 4,00 e pH 7,00.

4.6.6. Determinação de metais

A determinação de metais foi realizada utilizando a técnica de Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES / Modelo iCAP 7200 ICP-OES). Foi utilizada curva padrão contendo os seguintes elementos: cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), chumbo (Pb), potássio (K), magnésio (Mg), alumínio (Al) e prata (Ag). Para a leitura dos padrões e das amostras, estes foram previamente filtrados e diluídos em meio ácido utilizando HNO₃ 5 %.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos para os testes de contato entre a *Bacillus subtilis* e os meios sintéticos nitrificante e desnitrificante assim como os dados resultantes da caracterização das amostras de efluentes industriais: efluente bruto, efluente pré-tratado e efluente final.

5.1. Contato entre as bactérias e o meio de análise com carga nitrogenada

A bactéria foi colocada em contato com dois diferentes meios, um deles com caráter desnitrificante e outro com caráter nitrificante. Sobre os dois meios foram avaliados os parâmetros de DO, pH, concentração de nitrato, considerando o emprego da metodologia de cromatografia iônica de ânions e, também foi possível a análise simultânea de mais íons, como: sulfato, fosfato, fluoreto e cloreto.

O acompanhamento da DO permite avaliar o crescimento da bactéria. A Figura 5.1 mostra o comportamento deste parâmetro para o meio desnitrificante. A análise do gráfico possibilita identificar uma tendência de aumento, levando ao fato de que os valores obtidos foram baixos, e que a amostra apresentou valores levemente maiores que o branco, o que sugere que houve crescimento bacteriano no meio desnitrificante. Ainda assim, pode-se perceber que a situação de maior crescimento bacteriano obtido, foi no tempo de 96h, sugerindo que tempos maiores podem resultar em boas situações para estudo do desempenho da bactéria. Entretanto, o estudo Yang et. al., (2020), indica que o valor mínimo de crescimento esperado seria por volta 0,1 na escala de DO, no seu estudo ele também manteve o contato pelo período máximo de 120h. Neste sentido, um valor maior de DO, poderia proporcionar uma maior eficiência do sistema de estudo.

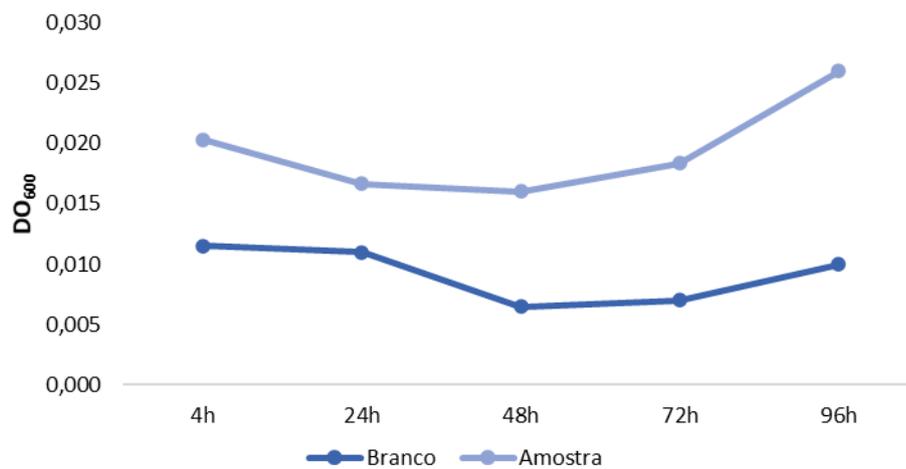


Figura 5.1. Densidade óptica 600nm para o Meio Desnitrificante.

A Figura 5.2 apresenta os resultados de DO para o meio nitrificante, onde é possível observar um comportamento semelhante ao ocorrido com o meio desnitrificante, com exceção de um ponto que apresentou valor superior a 0,2, porém considerando este como um ponto de comportamento diferente dos demais e ainda assim isolado, não podemos desconsiderar a possibilidade de este ser um efeito causado por alguma contaminação, ainda que todos os cuidados de manuseio de amostras tenham sido mantidos. Por se tratar do último ponto de teste, este não foi descartado, entretanto torna-se importante uma situação de repetição dos testes para poder entender o que de fato causou este efeito.

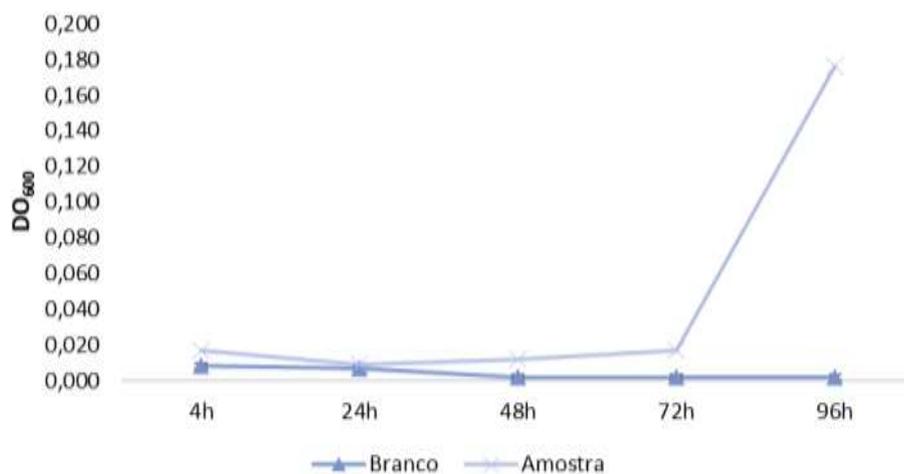


Figura 5.2. Densidade óptica 600nm para o Meio Nitrificante.

Em relação aos resultados de pH, ambos os meios partiram do pH igual a 7,00 e apresentaram uma pequena variação nos seus valores, tanto para os brancos, quanto para as amostras nos dois meios, estas variações são consideradas baixas e neste sentido são identificadas como eventos comuns do meio. As Figuras 5.3 e 5.4 apresentam os valores de pH para o MD e MN, respectivamente.

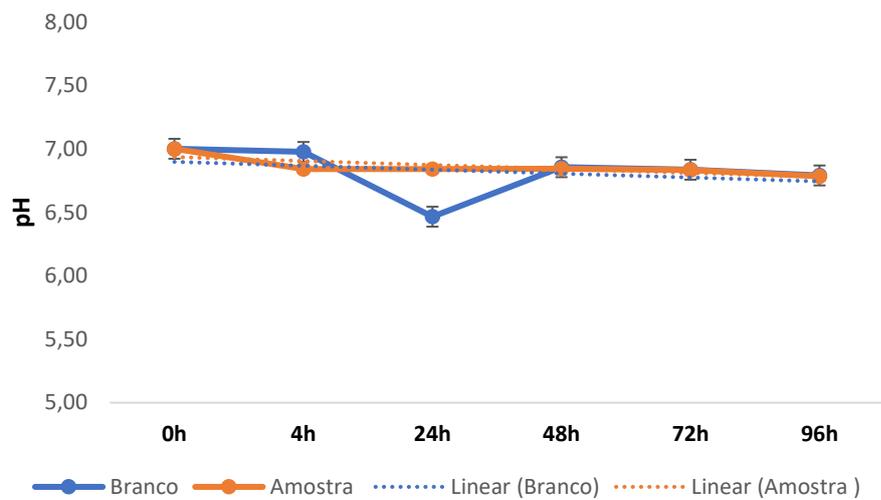


Figura 5.3. Variação do pH para o Meio Desnitrificante.

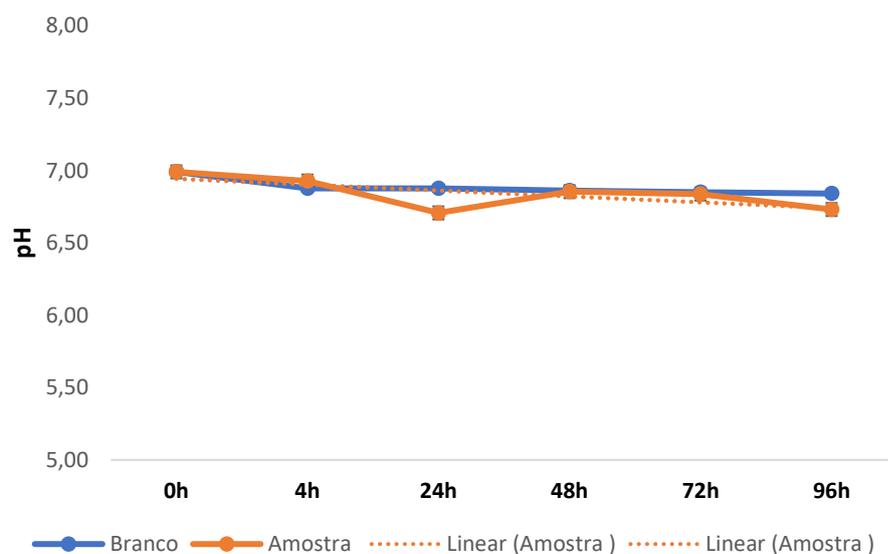


Figura 5.4. Variação do pH para o Meio Nitrificante.

É possível observar que os valores de pH se mantiveram na condição ótima para a bactéria (pH não inferior a 6, exposição a temperatura de 37 °C), mas ainda assim esse parâmetro não possibilitou uma situação de efetividade sobre o crescimento das *Bacillus subtilis* (MADIGAN, 2016; YANG, 2019).

A Figura 5.5 apresenta os resultados obtidos por cromatografia iônica de ânions para o MD. Em relação ao íon nitrato, inicialmente, tanto o branco quanto a amostra possuíam a mesma concentração deste íon. Ao longo do tempo, pode-se observar uma tendência de redução da carga de nitrato, em ambos. Entretanto, observou-se uma redução maior deste íon na amostra (cerca de 8%) após 96h de contato do meio com as bactérias. Yang et al. (2020) obtiveram valores de redução de pelo menos 50 % da carga nitrogenada em uma amostra sintética, utilizando a *Bacillus subtilis* proveniente de lodos de diferentes ambientes (florestas, lagos de cultivo, lodo ativado e sedimentos). Em seu estudo foram utilizadas as mesmas soluções referentes aos meios desnitrificante e nitrificante, entretanto a fonte de carbono utilizada foi o succinato de sódio, ainda assim, cabe ressaltar que o uso de diferentes fontes de carbono, como acetato, glicose, citrato e succinato não mostra diferenças significativas e não afetam parâmetros importantes.

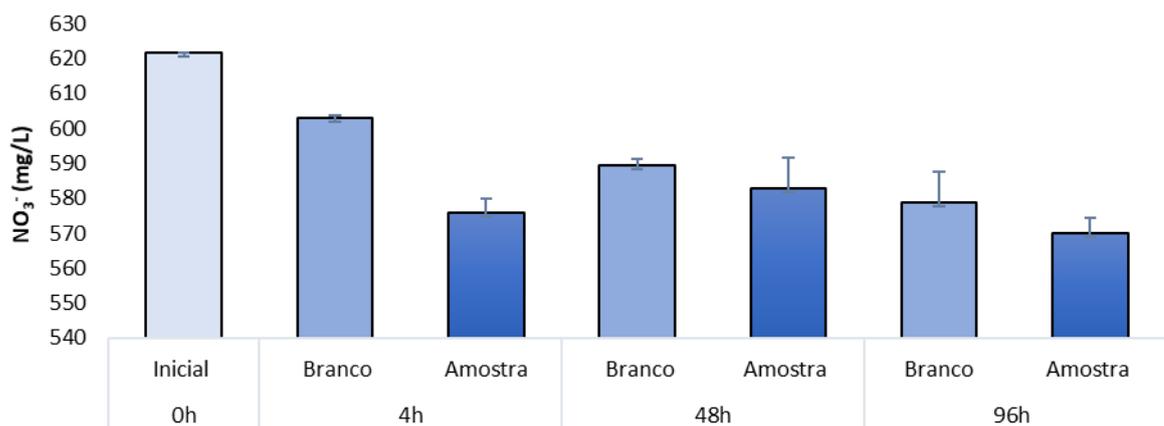


Figura 5.5. Concentração de Nitrato para o Meio Desnitrificante.

Este valor pode ser considerado baixo quando comparado a literatura, porém pode ser justificado pelo fato o crescimento bacteriano ter sido pequeno neste meio, como mostrado pelo resultado de DO.

Em relação às análises de cromatografia iônica terem possibilitado análises adicionais (cloreto, fluoreto e fosfato), se faz importante abrir para discussão os resultados obtidos para o MD.

A Figura 5.6 apresenta o resultado da cromatografia iônica para íons cloreto em MD. Observou-se um aumento significativo na concentração deste íon após 4h de contato com as bactérias e esta alta concentração manteve-se ao longo do ensaio. O branco manteve-se com valores de concentração de íons cloreto similar ao branco no tempo zero.

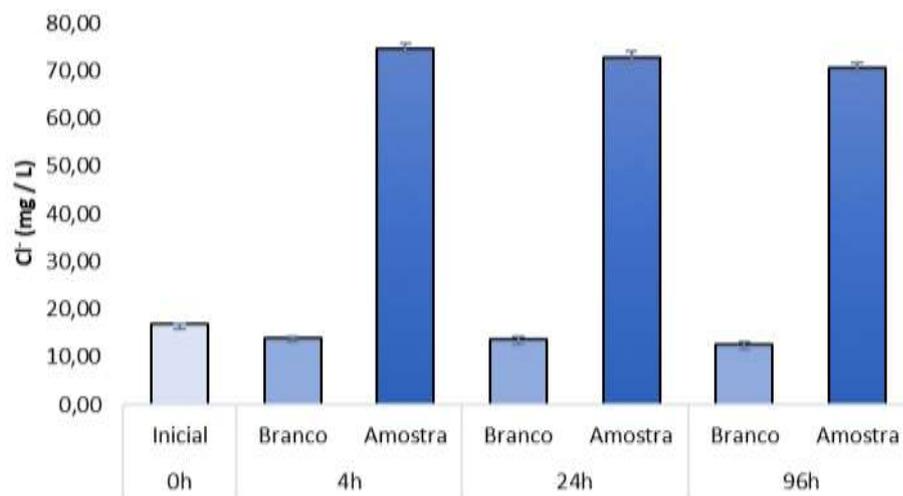


Figura 5.6. Concentração de Cloreto para o Meio Desnitrificante.

Em relação aos íons fluoreto (Figura 5.7), observou-se um aumento suave nos valores de concentração deste íon tanto para o branco quanto para a amostra contendo as bactérias. Ainda é possível notar um valor não linear para a amostra após 4h de teste. De maneira sequencial, tivemos nova queda e um crescimento gradativo para todos os pontos.

As variações ocorridas relacionadas aos íons cloreto, fluoreto e fosfato podem estar relacionadas ao fato destes íons serem partes remanescentes na solução e provenientes da interação dos macronutrientes e micronutrientes adicionados aos meios sintéticos para enriquecimento.

Entretanto, esta comprovação deve ser validada pelo monitoramento destes íons em solução durante o período de teste (KIM, 2005).

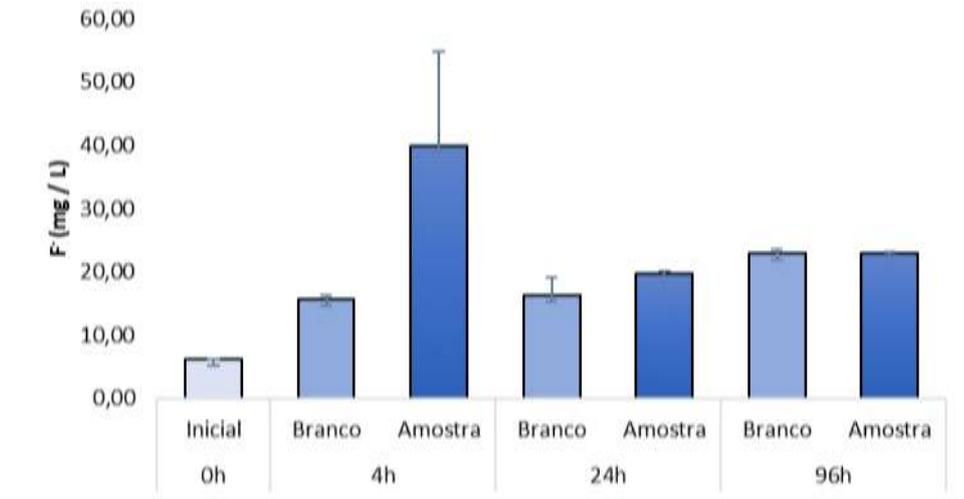


Figura 5.7. Concentração de Fluoreto para o Meio Desnitrificante.

A Figura 5.8 apresenta os valores de concentração de íons sulfato. É possível observar uma tendência de redução dos valores, tanto no branco quanto na amostra quando comparado com o valor inicial. Após 4h os valores de concentração mantiveram-se praticamente constante.

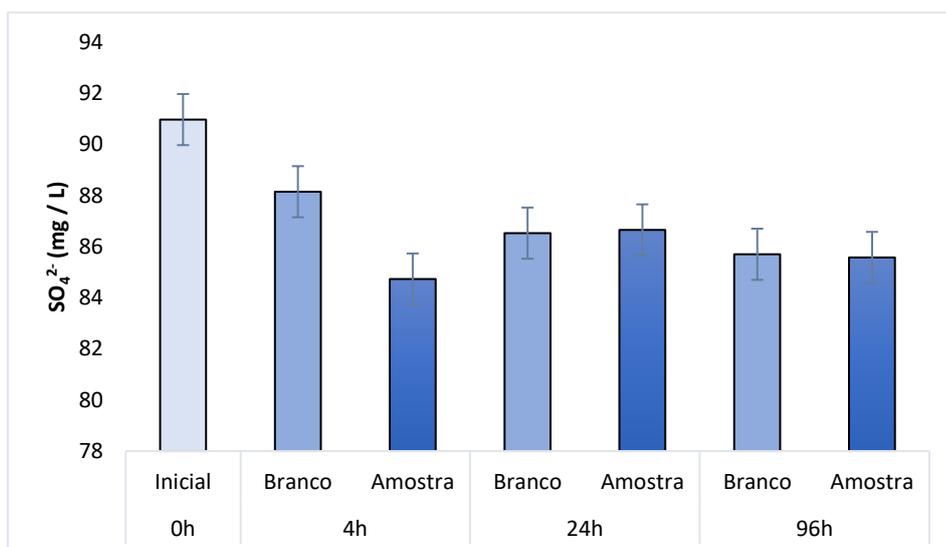


Figura 5.8. Concentração de Sulfato para o Meio Desnitrificante.

A análise de cromatografia iônica de ânions possibilitou a identificação da presença de íons fluoreto e fosfato, não sendo identificada a presença de íons nitrato no meio nitrificante.

A Figura 5.9 apresenta os resultados de concentração de íons fluoreto, onde houve uma tendência de aumento deste íon no meio. Também foi possível verificar que o aumento deste íon foi maior no MN quando comparado ao controle.

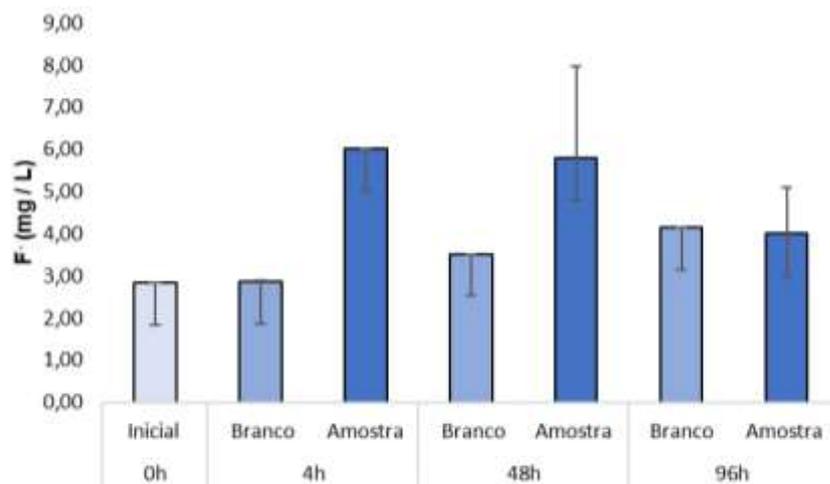


Figura 5.9. Concentração de Fluoreto para o Meio Nitrificante.

Na Figura 5.10 é apresentado os resultados dos íons fosfatos no MN. Não houve uma variação significativa da concentração deste íon ao longo do tempo de contato com as bactérias e também em relação ao branco.

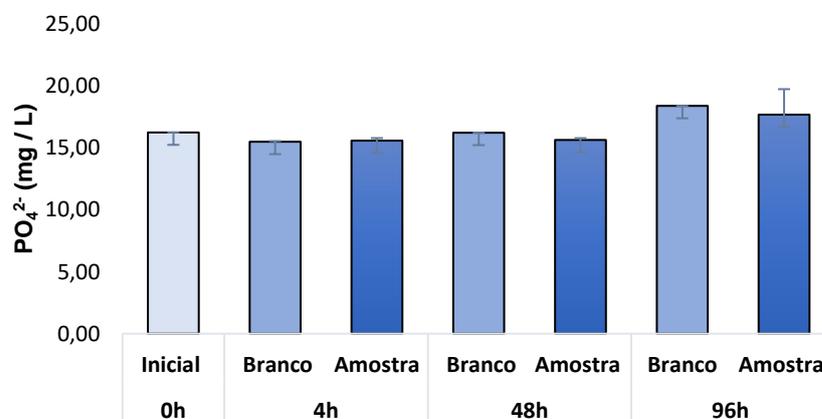


Figura 5.10. Concentração de Fosfato para o Meio Nitrificante.

Levando em conta a possibilidade adicional de análise dos grupos fluoreto, cloreto, sulfato e fosfato e a identificação das variações das suas quantidades nos meios de estudo, esta condição possibilita uma nova proposta de análise, buscando a identificação deste cenário e dos fenômenos ocorridos com estes íons. Tanto quanto a sua influência no meio quanto a possibilidade de reduzir concomitantemente estes, junto ao emprego das bactérias desnitrificantes no tratamento de efluentes industriais contendo níveis elevados de nitrogênio.

O teste de Gram possibilitou identificar a presença de bactérias gram-positivas na forma de Bacilos em ambos os meios, ao longo do período de teste.

No estudo conduzido por JINGJING, et. al., (2011), utilizando *Bacillus subtilis* em um sistema de reatores, através da imobilização da bactéria, atingiu uma redução de 99,55 % de NH_4^+ , entretanto ele destacou que altas quantidades de Oxigênio dissolvido e a relação C/N podem inibir o processo de remoção. Neste estudo foi possível obter um valor de remoção da carga de nitrato do meio desnitrificante de aproximadamente 8%. Desta forma, para a identificação de formas de aumentar a efetividade no uso das bactérias, se faz necessário o monitoramento das condições de Oxigênio a fim de identificar seus efeitos sobre o crescimento das bactérias assim como a capacidade de remoção da carga nitrogenada.

5.2. Resultados das Análises de Caracterização das amostras reais

A caracterização do efluente industrial coletado em três diferentes pontos possibilitou verificar o desempenho do tratamento de efluentes empregado pela empresa (tratamento químico) avaliando as condições em relação ao nitrogênio e identificando pontos estratégicos para emprego das bactérias como meio de tratamento adicional para redução da carga nitrogenada.

A Tabela 5.1, apresenta os resultados da caracterização do efluente para as análises de NTK, OD_i , OD_5 , DBO e DQO.

Tabela 5.1. Resultados dos testes de caracterização de uma amostra de efluente industrial.

Resultados	Efluente Bruto	Efluente Pré-tratado	Efluente Final
NTK (mg N / L)	527,87	85,82	76,83
OD _i (mg O ₂ / L)	5,77	5,82	7,32
OD ₅ (mg O ₂ / L)	5,05	4,94	6,88
DBO (mg O ₂ / L)	1,44	1,78	0,89
DQO (mg O ₂ / L)	0,19	0,45	0,22
pH	5,91	7,82	7,74

O valor encontrado para NTK no efluente final foi de 76,83 mg N/L, que ultrapassa o valor estabelecido para lançamento que é de 20 mg N/L (GIORDANO, 2004), demonstrando que o processo de tratamento atual utilizado não satisfaz as condições definidas para despejo de efluentes quanto a carga nitrogenada e indicando a urgente necessidade de práticas de intervenção para o controle dos níveis de nitrogênio. Quanto aos parâmetros de OD_i, OD₅, DBO, estes devem ser acompanhados e verificada a taxa de resolução após o tratamento, considerando a indicação de remoção de 60 % destes itens para despejo. Os valores encontrados para DQO apresentaram-se ligeiramente baixos, sendo necessária a repetição da análise para verificar a confiabilidade destes resultados. Os valores de pH estão em conformidade com a resolução de despejo, pH entre 5 e 9, conforme indicado pela Legislação (BRASIL, 2011).

Na Tabela 5.2 são apresentados os resultados da determinação de metais na amostra de efluente industrial. Os elementos Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Pb e Ag apresentaram-se em conformidade com a legislação de despejo de efluentes industriais. Entretanto, os elementos K e Mg não possuem valores de tolerância indicados, podendo ser devido ao fato destes serem minerais constituintes das águas. Ainda assim, é importante destacar o caso do Al, que também não possui valores limites de despejo indicados, mas possui um valor alto nesta amostra de efluente, assim como um comportamento de aumento para o efluente pré-tratado. Este resultado pode estar relacionado ao uso de agentes floculantes, porém uma brusca redução deste íon no efluente final, pode indicar que este Al estaria sendo precipitado em uma etapa posterior do processo de tratamento não sendo mais detectado no efluente final.

Tabela 5.2. Resultados da determinação de metais de uma amostra de efluente industrial.

Metais (ppm)	Efluente Bruto	Efluente Pré-tratado	Efluente Final
Cr	0	0	0
Co	0	0,001	0,001
Ni	0,002	0,002	0,003
Fe	0,148	0,021	0,509
Cu	0,021	0,013	0,007
Zn	0,137	0,162	0,003
Pb	0	0,001	0
K	3,935	6,488	15,626
Mg	0,201	0,024	4,829
Al	0,824	3,096	0
Ag	0	0,003	0,015

A caracterização prévia do efluente industrial possibilitou identificar a necessidade de proposição de técnicas que possam otimizar as condições de tratamento deste efluente, a fim de torná-lo adequado para despejo segundo regulamentação. No caso, dos dados apresentados aqui, pode-se perceber que mesmo após o tratamento final do efluente, este mantém um valor de carga nitrogenada de aproximadamente 3x o que a legislação permite. A possibilidade de utilização de bactérias (tratamento biológico) para este tratamento apresenta-se com grande potencial tecnológico, uma vez que, se trata de um processo de fácil empregabilidade e de forte impacto sobre o problema enfrentado pela empresa quanto ao despejo de seus efluentes.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram o potencial de aplicação deste método biológico no tratamento de efluentes com alta carga de nitrogênio. Considerando as particularidades da manipulação e uso de bactérias e todos os cuidados necessários para evitar contaminação de amostras por outros meios, pode-se perceber que as condições utilizadas de temperatura e agitação neste estudo são condições de fácil reprodução. Também foi observado que nas condições de estudo, não foi possível alcançar a quantidade mínima de bactérias dentro dos meios de análise, ainda assim, a quantidade de bactérias no meio propiciou uma redução da carga nitrogenada no meio desnitrificante de aproximadamente 8%. Por outro lado, são necessários mais estudos, como a reprodução deste modelo de monitoramento utilizando sistemas semelhantes a este, porém corrigindo a quantidade de bactérias utilizadas no meio, a fim de obter valores mais adequados de DO e, assim avaliar a efetividade das bactérias dando destaque a importância de analisar as concentrações relacionadas a ambos os íons, nitrato e amônio. Considerando o estudo de caracterização de um efluente industrial real, este pode ser identificado como uma matriz adequada de emprego da bactéria *Bacillus subtilis* como proposta para tratamento de efluente industrial contendo alta carga nitrogenada.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Partindo do fato de que o contato entre a bactéria *Bacillus subtilis* e o meio sintético desnitrificante, resultou numa redução de 8% da carga nitrogenada, a presente metodologia mostra-se como uma boa candidata para o tratamento de efluentes industriais com alta carga nitrogenada. Entretanto, foram identificadas situações de melhoria para esta metodologia, como adequação do crescimento das bactérias, assim como monitoramento dos íons fosfato, sulfato e cloretos em solução além dos íons amônio e nitrato.

Sugere-se como proposta para trabalhos futuros, um novo acompanhamento dos meios nitrificante e desnitrificante, mantendo as condições de temperatura, agitação e tempo de contato (37 °C / 200 rpm / 96h) porém partindo de uma condição inicial maior de crescimento de *Bacillus subtilis* (densidade óptica de 0,1), e realizando todos os testes aqui sugeridos neste trabalho.

A análise do efeito alcançado em novo contato, possibilitará, analisar e empregar os ajustes para o emprego da técnica em um efluente industrial real.

Ainda em relação a avaliação do comportamento da bactéria sobre os meios sintéticos, se faz importante entender o que ocorre com os íons; sulfato, cloreto, fosfato e fluoreto e a relação destes com a presença dos macronutrientes e micronutrientes envolvidos no processo de desenvolvimento da *Bacillus subtilis*.

Levando em conta a correção e o aperfeiçoamento destes pontos em aberto, pretende-se empregar a *Bacillus subtilis* em efluente industrial contendo alta carga nitrogenada e avaliar o desempenho do método biológico de tratamento na regularização dos parâmetros de descarte em relação a carga nitrogenada, devido ao efeito de redução deste.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. School of Civil and Environmental Engineering, Yeungnam University, Gyungsan, Process Biochemistry, South Korea. v. 41, p. 1709–1721. 2006.

ATKINS, T.L.; Overton, J.P.; Rourke, M.T.; Weller, F.A. Armstrong. Shriver and Atkins: Inorganic Chemistry. 5. ed. New York: Oxford University Press, 378-380p.

BASAK, K.; Mustafa, E. E.; Hale, O.; Ismail, K.; Pilot and full-scale applications of membrane processes for textile wastewater treatment: A critical review, **Journal of Water Process Engineering**, v. 42, p. 1-11, 2021.

BAUR, L. Estudo e identificação de Nitrogênio em efluentes de curtume. Porto Alegre. 2012. 136p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

BRASIL, Resolução n. 430, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA). Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional Do Meio Ambiente, Resolução n. 430, maio/2011.

BUENO, R. F. Avaliação da nitrificação e desnitrificação simultânea em estação de tratamento de esgoto em escala real. São Paulo. 2016. Dissertação (Doutorado em Ciências). Escola Politécnica de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, área de concentração de Engenharia Hidráulica.

CARVALHO, Karina Querne de; Passig, Fernando Hermes; Kreutz, Cristiane. **Tratamento de efluentes**. 1 ed. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2011. *E-book*.

CARVALHO, N. L.; Hentz, P.; Silva, J. M. Barcellos, A. L. Reutilização de águas residuárias. *Revista Monografias Ambientais – REMOA*, v. 14, p. 3164–3171, 2014.

CASTRO, J. S. Biofilme de Microalgas no Solo: Emissão De Gases De Efeito Estufa, Volatilização de Amônia e Crescimento de *Pennisetum Glaucum*. Viçosa: 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-graduação em Engenharia.

CHAI, H.; Xiang, Y.; Chen, R.; Shao, Z.; Gu, L.; Li, L.; He, Q. Enhanced simultaneous nitrification and denitrification in treating low carbon-to-nitrogen ratio wastewater: Treatment performance and nitrogen removal pathway. *Bioresource Technology*, v. 280, p. 51–58, 2019.

CUEVAS, A.; Macdonald, D. Measuring and interpreting the lifetime of silicon wafers. ***Solar Energy Materials & Solar Cells***, v. 76, p. 255-262, 2004.

DELDUQUE, T. P. Remoção da amônia por air stripping em canais corrugados helicoidais. Londrina: 2017. Dissertação parcial (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental.

EATON, A. D.; Clesceri, L. S.; Rice, E. W.; Greenberg, A. E. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. Washington: American Public Health Association; American Water Works Association; Water Pollution Control Federation, 2005. 3200p.

FILHO, P. K. T. Remoção e Recuperação de Nitrogênio Amoniacal de Efluente Gerado no Processamento do Couro. Londrina: 2015. Dissertação parcial (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambienta.

FORTINO, Patrícia. Pós-tratamento de efluente têxtil usando coagulação/floculação combinado com processos de separação por membranas. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Porto Alegre. 2012. 98 p. Programa de Pós-

graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

GERHARDT, R.; Reisdorfer, G.; Cardoso, M. G. Remoção de Nitrogênio e Fósforo de Efluente Industrial através da Precipitação de Estruvita. *TECNOLÓGICA*, v. 22, n. 1, 35–40, 2017.

GIORDANO, G. Tratamento e controle de efluentes industriais. Mato Grosso: Universidade Federal do Mato Grosso, 2004. 81p.

GOSWAMI, L.; Vinoth Kumar, R.; Borah, S. N.; Arul Manikandan, N.; Pakshirajan, K.; Pugazhenthii, G. Membrane bioreactor and integrated membrane bioreactor systems for micropollutant removal from wastewater: A review. *Journal of Water Process Engineering*, v. 26, p. 314–328, 2018.

GUIMARÃES, J. R.; Nour, E. A. A. Tratando nossos esgotos: Processos que imitam a natureza. *Cadernos Temáticos de Química Nova Na Escola*, Ed. Especial, p. 19–30, 2001.

HASSARD, F.; Biddle, J.; Cartmell, E.; Jefferson, B.; Tyrrel, S.; Stephenson, T. Rotating biological contactors for wastewater treatment - A review. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 94, p. 285–306, 2015.

HU, H.; Ren, H. Removal of bioavailable dissolved organic nitrogen in wastewater by membrane bioreactors as posttreatment: Implications for eutrophication control. *Bioresource Technology*, v. 271, p. 496–499, 2019.

ILYAS, H.; Masyh, I. The performance of the intensified constructed wetlands for organic matter and nitrogen removal: A review. *Journal of Environmental Management*. v. 198, p. 372–383, 2017.

JINGJING, Xiao; Zhu, Changxiong; Sun, Dongyuan; Guo, Ping; Tian, Yunlong. Removal of ammonium-N from ammonium-rich sewage using an immobilized *Bacillus*

subtilis AYC bioreactor system. Journal of Environmental Sciences. Pg. 1279-1285. 2011.

KARGI, F.; Eker, S. Comparison of performances of rotating perforated tubes and rotating biodiscs biofilm reactors for wastewater treatment. Process Biochemistry, v. 37, p. 1201-1206, 2002.

KIM, J. K. Park, K. J. Cho, K. S. Nam, S-W. Park, T-J. Bajpai. R. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. Bioresource Technology. v. 96. p. 1897–1906. 2005.

KIM, M. Nakhla, G. Effect of Membranes on Refractoryn Dissolved Organic Nitrogen. Department of Civil and Environmental Engineering, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada. Water Environment Research, v. 82, p. 281-288. 2010.

KLOKE, A.; Rubenwolf, S.; Bücking, C.; Gescher, J.; Kerzenmacher, S.; Zengerle, R.; von Stetten, F. A versatile miniature bioreactor and its application to bioelectrochemistry studies. Biosensors and Bioelectronics, v. 25, p. 2559–2565, 2010.

LI, N. Zeng, W. Yang, Y. Wang, B. Li, Z. Peng, Y. Oxygen mass transfer and post-denitrification in a modified rotating drum biological contactor. Biochemical Engineering Journal. v. 144, p. 48-56. 2019.

LIU, H. Chen, N. Feng, C. Tong, S. Li, R. Impact of electro-stimulation on denitrifying bacterial growth and analysis of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model in a bio-electrochemical denitrification reactor. Bioresource Technology. China University of Geosciences (Beijing), v. 232, p. 344–353. 2017.

MADIGAN, M. T. Martinko, J. M. Bender, K. S. Buckley, D. H. Stahl, D. A. Microbiologia de Brock. Editora: Pearson Education, Inc. Traduzido por: Artmed. Ed. 14. P. 1032. 2016.

MELLA, Bianca. Remoção de cromo de banhos residuais de curtimento através de precipitação química e eletrocoagulação. Dissertação (Mestrado em engenharia). Porto Alegre. 2013. 106 p. Programa de Pós-graduação em engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

MIAO, L. Yang, G. Tao, T. Peng, Y. Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments – A review. *Journal of Environmental Management* v. 235. p. 178–185. 2019.

NAKAGAMA, A. Avaliação De Um Sistema Bioeletroquímico (Mfc – Microbial Fuel Cell) Como Alternativa para Remoção de Nitrato em Águas Subterrâneas. São Paulo: 2017. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Recursos Minerais e Hidrogeologia.

OLIVEIRA, V. V. Karina. Caracterização de comunidade microbiana em biofilme associada a filtro biológico para o tratamento de efluentes da aquacultura. Dissertação (Mestrado em recursos hídricos e saneamento ambiental). Porto Alegre. 2010. 122 p. Programa de Pós-graduação em recursos hídricos e saneamento ambiental. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **1 em cada 3 pessoas em todo o mundo não tem acesso a água potável**. Genebra: OMS 2019.

PANDEY; A.K.; Kumar, R. R.; Kalidasan B; Laghari, I. A.; Samykano, M.; Kothari, R.; Abusorrah, A. M.; Sharma K.; Tyagi, V.V. Utilization of solar energy for wastewater treatment: Challenges and progressive research trends, **Journal of Environmental Management**, v. 297, p. 1-23, 2021.

PENG, Y. Lie, J. Lu, J. Xiao, L. Yang, L. Characteristics of microbial community involved in early biofilms formation under the influence of wastewater treatment plant effluent. *Journal of environmental sciences*. v. 66. p. 113 – 124. 2018.

PEREIRA, A. C. A.; Garcia, M. L. Efeitos da Disposição de Lodo de Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) de Indústria Alimentícia no Solo: estudo de caso. *Eng. Sanit. Ambient.* v. 22, n. 3, p. 531–538, 2017.

RIO GRANDE DO SUL. Lei n. 10.330, de 27 de dezembro de 1.994. Dispõe sobre os critérios e padrões de emissão de efluentes líquidos para as fontes geradoras que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Conselho Estadual Do Meio Ambiente – CONSEMA.

ROCHA, K. M.; Salomani, S. P.; Santos, R. H.; Goldbach, A. Monitoramento e avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos de uma estação de tratamento de efluentes com sistema de lodos ativados em uma agroindústria no meio oeste de Santa Catarina. *Revista de Engenharia Civil IMED*, v. 3, p. 25–36, 2016.

SONG, Z.-F. An J. Fu, G.-H. Yang, X.-L. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*. V. 319 p. 188–193. 2011.

SUN, F. Y.; Wang, X. M.; Li, X. Y. An innovative membrane bioreactor (MBR) system for simultaneous nitrogen and phosphorus removal. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 1749–1756, 2013.

SYMONDS, E. M.; Cook, M. M.; McQuaig, S. M.; Ulrich, R. M.; Schenck, R. O.; Lukasik, J. O.; Van Vleet, E. S.; Breitbart, M. Reduction of nutrients, microbes and personal care products in domestic wastewater by a benchtop electrocoagulation unit. *Scientific Reports*. v. 5, p. 1-8, 2015.

TING Yang, Yu Xin, Liang Zhang, Zhenghua Gu, Youran Li, Zhongyang Ding, Guiyang Shi, Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains, *Biomass and Bioenergy*, v. 140, 2020.

TONETTI, A. L.; Filho, B. C.; Guimarães, J. R.; Fadini, P. S.; Nicolau, C. E. Desnitrificação em um sistema simplificado de tratamento de esgoto. *Eng Sanit Ambient*, v. 18, p. 381–392, 2013.

UCKER, F. E.; Almeida, R. A.; Kemerich, P. D. C. Remoção de nitrogênio e fósforo do esgoto sanitário em um sistema de alagados construídos utilizando o capim vetiver. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. v. 7, p. 87-98, 2012.

UNESCO. Relatório Mundial das Nações Unidas sobre Desenvolvimento dos Recursos Hídricos. UNESCO World Water Assessment Programme. 2021. 12 p.

VELP SCIENTIFICA. Automatic steam distilling unit – Operating manual. UDK 130A Usmate, 1996.

VIEIRA, D. A. de P. Fernandes, N. C. de A. Microbiologia Aplicada. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. Inhumas. p. 90. 2012.

VIEIRA, D. A. de P. Fernandes, N. C. de A. Microbiologia Geral. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. Inhumas. p. 100. 2012.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 2ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. 15p.

VON SPERLING, M. Lodos Ativados: Princípios Do Tratamento Biológico De Águas Residuárias. 2ª ed. Belo Horizonte: UFMG, 2002. 428 p.

YANG, J-R. Wang, Y. Chen, H. Lyu, Y-K. Ammonium removal characteristics of an acid-resistant bacterium *Acinetobacter* sp. JR1 from pharmaceutical wastewater capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *Bioresource Technology*. v. 274. p. 56–64. 2019.

YANG, X.-P. Wang, S.-M. Zhang, D.-W. Zhou, L.-X. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*. v. 102. p. 854–862. 2011.

YI R.; Jinyan Y.; Xiaoyang, L.; Lu, L.; Weiming, Z. Different combined systems with Fenton-like oxidation and ultrafiltration for industrial wastewater treatment, **Journal of Membrane Science**, v. 638, p. 1-10, 2021.

YU, G.; Peng, H.; Fu, Y.; Yan, X.; Du, C.; Chen, H. Enhanced nitrogen removal of low C/N wastewater in constructed wetlands with co-immobilizing solid carbon source and denitrifying bacteria. *Bioresource Technology* v. 280, p. 337–344, 2019.

ZHANG, S.; Xiao, R.; Liu, F.; Zhou, J.; Li, H.; Wu, J. Effect of vegetation on nitrogen removal and ammonia volatilization from wetland microcosms. *Ecological Engineering*, v. 97, p. 363–369, 2016.

ZHAO, J.; Feng, L.; Yang, G.; Dai, J.; Mu, J. Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification. *Bioresource Technology*, v. 243, p. 800–809, 2017.

ZIM, Graziela. Desempenho de reatores biológicos aeróbios de leito fluidizado inverso na remoção de carga orgânica. Porto Alegre. 2006. 102 p. Dissertação (Mestrado em Recursos hídricos e Saneamento Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

ZOPPAS, M. F.; Bernardes, A. M. Meneguzzi, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. *Eng Sanit Ambient.* v. 21, p. 29–42, 2016.

ZOPPAS, F. M. Estudo da remoção de nitrogênio em efluentes por nitrificação e desnitrificação simultânea. Porto Alegre. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br