

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**UTILIZAÇÃO DE REATORES MICROBIANOS COM CÉLULAS
IMOBILIZADAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE
BEBIDAS**

Juliana Gisele Belote D’Arcadia Cruz

Bióloga - UNESP

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

Orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos**

Campinas, SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C889u Cruz, Juliana Gisele Belote D’Arcadia
Utilização de reatores microbianos com células imobilizadas no
tratamento de efluente de uma indústria de bebidas / Juliana Gisele
Belote D’Arcadia Cruz. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Efluente industrial. 2. Cervejaria. 3. Biofiltro aeróbio. 4.
Células imobilizadas. 5. Biorreatores. I. Durrant, Lucia Regina.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars-fea)

Título em inglês: Use of microbial reactors containing immobilized cells on the treatment of
the wastewater of a beverage industry

Palavras-chave em inglês (Keywords): Industrial effluent, Brewery, Aerobic biofilter,
Immobilized cells, Bioreactors

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Marta Teixeira Duarte

Alexandre Ponezi

Ranulfo Monte Alegre

Fumio Yokoya

Peter Schnneider

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
(ORIENTADORA)**

**Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
(MEMBRO)**

**Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi
(MEMBRO)**

**Prof. Dr. Fumio Yokoya
(MEMBRO)**

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(MEMBRO)**

**Prof. Dr. René Peter Schneider
(MEMBRO)**

**Ao meu filho Pedro, luz e razão da minha vida,
Dedico**

AGRADECIMENTOS

À DEUS, sempre presente em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, minha admiração pelo exemplo de vida, coragem e união.

A minha irmã Flávia e aos meus irmãos Carlos e Marcos, por todo carinho e amor.

Ao Vinícius, companheiro dos meus sonhos e ideais, obrigada por seu amor.

Ao Rubens e a Maria Inês por todo apoio e carinho durante estes anos.

À Profa. Dra. Lúcia R. Durrant, pela orientação e confiança.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, pelas sugestões, contribuições e pelo exemplo de amor a pesquisa.

À Mara, Cibelle, Deborah, Wagner e estagiários dos laboratórios do Biomavale, pela amizade e ajuda sempre presente.

Ao Finotti por disponibilizar a infra-estrutura do Biomavale.

À Mirella, pela amizade e apoio constante na coleta de amostras.

À Rosângela e funcionários da SABESP, pelos auxílios diversos.

Ao Marcão, Cosme e a todos da secretaria de pós-graduação.

Ao Emerson, Fábio, Elisângela, Ísis e a todos do laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pela ajuda e atenção.

Ao CNPQ, pela ajuda financeira.

Aos professores da Banca Examinadora, pelas correções e sugestões feitas no boneco.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, ou que compartilharam com o meu crescimento como pessoa e pesquisadora.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVO GERAL	4
2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. <i>Fabricação de Cerveja e Refrigerante</i>	5
3.1.3 - <i>Características dos Efluentes das Indústrias de Cerveja e Refrigerantes</i>	7
3.1.4. TRATAMENTO BIOLÓGICO	10
3.1.5 - <i>Imobilização</i>	14
3.1.6. - <i>Métodos Normalmente Utilizados na Determinação da Carga Poluidora de Efluentes Industriais</i>	17
4- MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1- MATERIAL	31
4.1.1 - <i>Efluente industrial</i>	31
4.2- MÉTODOS	34
4.2.3 - <i>Coleta e preservação das amostras</i>	36
4.2.4 - <i>Preparação do inóculo</i>	37
5.1- ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO EFLUENTE INDUSTRIAL	46
5.1.1- <i>Análise comparativa do pH do efluente bruto e do efluente tratado</i>	46
5.1.2- <i>Contagem microbiana, controle da temperatura e do oxigênio dissolvido</i>	47
5.1.3 - <i>Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Fósforo</i> ...	47
5.1.4 – <i>Turbidez</i>	49
5.1.5 – <i>Sólidos Sedimentáveis (SS)</i>	50
5.1.6 - <i>Condutividade</i>	52
5.1.7. <i>Nitrogênio Amoniacal Total (NA)</i>	53
5.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS DE TOXICIDADE	55
5.2.1 – <i>Toxicidade frente a <i>Daphnia similis</i></i>	55
5.2.2 – <i>Toxicidade frente a germinação de <i>Lactuca sativa</i> (alface)</i>	57
5.3- IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	59
6- CONCLUSÕES	63
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Índice de tabelas

Tabela 1: Substâncias contaminantes presentes no efluente de cervejarias (REINOLD,1997).....	10
Tabela 2: Condutividade (uS/cm) do efluente bruto e do efluente tratado.	53
Tabela 3 - Concentração molar de nitrogênio amoniacal total, em diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH/h) de efluente bruto e tratado.	55
Tabela 4: Resultados obtidos com o ensaio de toxicidade com o microcrustáceo <i>Daphnia similis</i> , utilizando o efluente bruto e o tratado pelo sistema de biofiltros, em diferentes tempos de retenção hidráulica.	56
Tabela 5: Avaliação da toxicidade aguda empregando-se o ensaio biológico com <i>Daphnia similis</i> , no efluente em diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH/h).	57
Tabela 6: Porcentagem de variação do crescimento radicular de sementes de <i>Lactuca sativa</i> no efluente pré e pós tratamento biológico.....	58

Índice de figuras

Figura 1. Foto aérea da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Cia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP/Assis - (A = lagoas anaeróbias; F = lagoas facultativas).....	32
Figura 2. Ponto de coleta na saída do efluente do sistema de tratamento da indústria.....	33
Figura 3. Sistema de reatores para experimento em fluxo contínuo (dimensões unitárias: volume - 4.000 mL, altura - 26 cm, diâmetro - 14,5 cm).....	35
Figura 4: Argila expandida quebrada para a utilização, como suporte nos biofiltros.	36
Figura 5. Esquema básico de um teste de toxicidade. Fonte: CETESB, (1992).....	41
Figura 6: Análise Comparativa do pH do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes Tempos de retenção hidráulica em hora (TRH/h).	46
Figura 7: Análise Comparativa de Fósforo, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO mg/L 5 dias 20 °C) e Demanda Química de Oxigênio (mg/L) do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes Tempo de Retenção Hidráulica (TRH/h).....	48
Figura 8: Análise Comparativa de Turbidez do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes TRH/h.....	50
Figura 9: Análise Comparativa de Sólidos Sedimentáveis do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes TRH/h.	51
Figura 10: Porcentagem de diminuição da condutividade (uS/cm) do efluente após tratamento em diferentes TRHs.....	52
Figura 11: Fotos das análises microscópicas de amostras coletadas nos biorreatores.	59
Figura 12: Análise filogenética de seqüências parciais do gene RNA ribossomal 16S. A distância evolutiva foi baseada no modelo Kimura 2p e a árvore filogenética foi reconstruída pelo método <i>Neighbour Joining</i> , utilizando o programa Mega 2.0. Valores de <i>Bootstrap</i> maiores que 70% estão indicados na árvore. O número de acesso GenBank ou RDP está entre parênteses. <i>Deferribacter thermophilus</i> BMA1 ^T foi usada como <i>outgroup</i>	62

RESUMO

O presente estudo avaliou a utilização da tecnologia de tratamento de despejos líquidos de uma indústria cervejeira e de refrigerantes pelo sistema biológico aeróbio. Buscou-se a remoção da carga orgânica mediante quantificação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio amoniacal total, turbidez, sólidos sedimentáveis (SS), fósforo (P), condutividade e toxicidade. O sistema de tratamento proposto foi constituído por quatro reatores em série com volume total de 16 L. A alimentação foi realizada de forma contínua pela parte inferior e por gravidade. Para a imobilização dos microrganismos nos reatores foi utilizado, como suporte, argila expandida. Para o sistema aeróbio foi utilizada aeração prolongada mediante injeção ascendente de oxigênio. As análises foram realizadas diariamente, no afluente do reator e no efluente tratado em diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH/h). Os resultados obtidos mostraram que o sistema de tratamento, empregando 4 reatores acoplados, foi eficiente para a remoção da carga orgânica poluente do efluente da indústria. Ocorreu diminuição da DQO em todos os tempos de retenção hidráulica testados. O TRH 1,9 mostrou ser o mais eficiente, visto que é o tempo com a maior vazão, fato de extrema importância para o tratamento de efluentes industriais. Neste TRH houve maior porcentagem de remoção da DBO (67,4%), toxicidade com microcrustáceo *Daphnia similis* (52,3%), condutividade (13,13%), além de significativa remoção da DQO (58,7%).

Palavras-chave: efluente industrial, cervejaria, biofiltro aeróbio, biorreatores, células imobilizadas, argila expandida.

ABSTRACT

The present study the treatment of the waste waters of a beer and soft drink industry by an aerobic biological system was evaluated. The removal of the organic load by means of the quantification of the biochemical oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD), total ammoniacal nitrogen, turbidity, sedimented solids (SS), phosphorus (P), conductivity and toxicity. Were determined proposed the consisted of four reactors in series with a total volume of 16 L. The feeding was carried out carried out continuous by through the of the bioreactor inferior part and by gravity. Expanded clay was used as support for the immobilization of the microorganisms in the reactors. Continuous aeration by means of ascending injection of oxygen was used for the aerobic system. The analyses were performed daily in samples from the treated and untreated industrial effluent using different times of hydraulic retention (HRT/h). The results showed that the treatment system, using 4 connected reactors was efficient for the removal of the pollutant organic load of the industrys effluent. Reduction of the COD occurred in all the tested hydraulic retention times used HRT of 1.9 was found to be the most efficient HRT, since it was the time with the hioghest outflow, fact that is of extreme importance for the treatment of industrial effluents. In this HRT there was a greater percentage of reduction of the BOD (67.4%), the toxicity with the *Daphnia similis* (52.3%) and conductivity (13.13%), besides the significant reduction of the COD (58.7%).

Key words: industrial effluent, brewery, aerobic biofilter, bioreactor, immobilization cells, expanded clay.

1- INTRODUÇÃO

A água é o recurso natural mais importante para assegurar a vida e a saúde humana, elemento chave da indústria, na geração de energia elétrica, na agricultura, transporte e outras atividades econômicas.

Juntamente com a escassez causada pela demanda crescente, nos países industrializados, o problema da poluição das águas doces representa uma séria preocupação e as atividades industriais são consideradas as principais fontes de poluentes tóxicos desse recurso natural.

As descargas de águas residuárias nas redes coletoras de esgotos municipais podem provocar a corrosão dos coletores, problemas de saúde nos trabalhadores responsáveis pela manutenção e toxidez ou sobrecarga aos processos biológicos de tratamento. Deve-se ainda considerar que a disposição dessas águas no solo pode provocar, em determinadas situações, a contaminação do lençol freático ou o acúmulo de produtos tóxicos em plantas e animais. Se lançados em cursos de água, esses efluentes podem provocar, dependendo da quantidade em que são dispostos e de sua composição físico-química, a destruição da vida aquática, originalmente ali existente.

Mesmo que alguns processos físicos ou químicos sejam freqüentemente utilizados nas indústrias de bebidas e alimentos, os processos biológicos são os principais métodos utilizados para tratar estas descargas líquidas. Também na indústria cervejeira pode-se empregar microrganismos com a finalidade de minimizar problemas associados com a disposição dos resíduos de cerveja e dos líquidos que saem da compressão dos grãos.

Os efluentes das cervejeiras e de refrigerantes merecem grande atenção, pois contribuem com uma grande quantidade de água residuária contendo fluxo rico em

contaminantes orgânicos. De acordo com VON SPERLING (2005), a faixa de consumo de água nas indústrias de cerveja e refrigerante é de 2-10 m³ e 2-5 m³ / m³ de produto, respectivamente.

VRIENS *et al.* (1990) citam que a indústria cervejeira e de maltagem utilizam grande quantidade de água, sendo que apenas 10 a 25% são destinadas ao consumo humano. O tratamento biológico dos resíduos provenientes dessas indústrias enfrenta problemas por causa de alterações que ocorrem na composição e no pH da água residuária. No entanto, esses problemas podem ser evitados pelo uso de uma planta de lodo ativado de baixa carga com um tempo longo de retenção hidráulica como, por exemplo, o uso de uma vala oxidativa. Em tal planta a biodegradação do resíduo realiza-se rapidamente.

Apesar da tendência desde os anos 80 para os sistemas anaeróbios, a maioria dos tratamentos em cervejarias é feita por sistemas aeróbios. Esse tipo de tratamento requer menor área de operação, é mais simples, versátil e possui boa segurança operacional. Além da produção de gás metano, que pode ser usado na obtenção de energia, as vantagens dos sistemas anaeróbios estão no baixo consumo de energia e na pequena geração de lodo excedente, em comparação com o tratamento aeróbio. Entretanto, demandam longo período de tempo para reinício após parada e necessidade de pessoal mais qualificado para a operação do mesmo.

A Resolução CONAMA 357, do Ministério do Meio Ambiente, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes:

- pH entre 5 a 9;
- temperatura: inferior a 40°C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C na zona de mistura;

- materiais sedimentáveis: até 1 mL/L em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;
- regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vezes a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente;
- óleos e graxas:
- óleos minerais: até 20mg/L;
- óleos vegetais e gorduras animais: até 50mg/L; e
- ausência de materiais flutuantes.

Consta nesta resolução que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor e o valor máximo permitido para parâmetros inorgânicos e orgânicos.

O gerenciamento futuro dos recursos hídricos exigirá grandes esforços para que a água seja usada de modo mais eficiente e para proteger sua qualidade. Deve-se contribuir com diversas ações visando a preservação do meio ambiente. As pesquisas em escala laboratorial são de extrema importância para o levantamento de dados para projetos de sistemas de tratamentos de efluentes.

Desta forma, o presente trabalho utilizou reatores microbianos aeróbios como método para a redução da carga orgânica do efluente de uma indústria de cerveja e refrigerantes da região do Vale do Paranapanema, com o objetivo de gerar informações

laboratoriais, que possam ser úteis para a implementação de um sistema de tratamento do efluente em estudo.

2- OBJETIVO GERAL

Obter informações laboratoriais que possam ser úteis para a implementação de um sistema de tratamento do efluente em estudo, visando minimizar possíveis problemas na rede pública de coleta de esgotos da cidade de Assis/SP.

2.1- Objetivos Específicos

1. Diminuição da demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), turbidez, sólidos sedimentáveis (SS), condutividade, nitrogênio amoniacal total, fósforo (P) e toxicidade do efluente da indústria de bebidas MALTA;
2. Utilização de microrganismos, obtidos da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) da SABESP local, como consórcio microbiano para a estabilização do efluente em estudo;
3. Adequação do efluente industrial ao tratamento biológico da ETE de Assis.
4. Utilização de reatores aeróbios de fluxo contínuo com células imobilizadas para verificação da melhor eficiência de remoção da carga orgânica do efluente em estudo;
5. Aplicação de métodos moleculares no estudo da diversidade microbiana, presente nos biorreatores;
6. Verificar a presença de protozoários nos biorreatores através de microscopia óptica.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fabricação de Cerveja e Refrigerante

Para que se possa ter uma visão ampla do problema, é conveniente conhecer, ao menos em linhas gerais, os processos de fabricação envolvidos na indústria em estudo (VILLEN, 2001).

3.1.1 Processo de fabricação de cerveja

Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Modernamente, com exceção à Alemanha, cereais como milho, arroz e trigo também são utilizados, em substituição parcial ao malte. O açúcar, em pequenas proporções, também pode ser usado (SINDICERV, 2001).

Os processos envolvidos na produção são:

- Moagem do malte e dos adjuntos (outros cereais);
- Mistura com água;
- Aquecimento para facilitar a dissolução;
- Transformação do amido em açúcar pelas enzimas do malte;
- Filtração para separar as cascas do grão de cevada e dos adjuntos;
- Adição de lúpulo;
- Fervura do mosto para dissolução do lúpulo e esterilização;
- Resfriamento.

Na primeira fase ocorre a mistura do malte e adjuntos em água visando a obtenção de um líquido açucarado chamado mosto. A transformação de amido em açúcar por conta da ação das enzimas do malte é fundamental ao processo.

Na fase de fermentação, após o resfriamento, o mosto recebe a levedura e é acondicionado nos fermentadores. Nessa etapa, o fermento transforma o açúcar do mosto em álcool e gás carbônico, obtendo, assim, a energia necessária à sua sobrevivência. A temperatura deve ser controlada entre 10° e 13 °C para produzir o sabor adequado à cerveja.

Sabe-se hoje que em uma cerveja tipo *pilsen* pode-se encontrar mais de 3.000 compostos químicos diferentes, a maior parte originada durante a fermentação, responsáveis pelo aroma e sabor do produto.

Finalizada a fermentação, a cerveja é resfriada a zero grau, a maior parte do fermento é separada por decantação e tem início a maturação. Nessa fase algumas substâncias indesejadas oriundas da fermentação são eliminadas e o açúcar residual presente é consumido pelas células de fermento remanescentes, em um fenômeno conhecido por fermentação secundária.

Após maturada, a cerveja passa por uma filtração, que visa eliminar partículas em suspensão, principalmente células de fermento, deixando a bebida transparente e brilhante.

A próxima etapa é o processo de envazamento que pode ser feito em garrafas, latas ou barris. Logo após, visando conferir maior estabilidade ao produto, a cerveja é submetida ao processo de pasteurização a 60 °C.

A cerveja portanto, é de origem natural, fabricada com água e cereais. Dada a sua condição de derivada de produtos agrícolas, tem sua normatização e controle subordinados ao Ministério da Agricultura, tanto no Brasil como na maioria dos países.

3.1.2. Processo de fabricação de refrigerantes

Refrigerante é a bebida gaseificada, obtida pela dissolução, em água potável, de suco ou extrato vegetal de sua origem, adicionada de açúcares. O refrigerante deverá ser obrigatoriamente saturado de dióxido de carbono, industrialmente puro. Não é permitida a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não calóricos na fabricação de refrigerante.

Os refrigerantes de laranja, tangerina e uva deverão conter no mínimo 10% em volume do respectivo suco natural na sua concentração. Soda limonada ou refrigerante de limão deverão conter, obrigatoriamente, no mínimo 2,5% em volume de suco de limão. O refrigerante de guaraná deverá conter, obrigatoriamente, uma quantidade mínima de dois centésimos de grama de semente de guaraná (gênero “Paullinia”), ou seu equivalente em extrato, por cem mililitros de bebida. O refrigerante de cola deverá conter semente de noz de cola ou extrato de noz de cola. O refrigerante de maçã deverá conter no mínimo 5% em volume de suco de maçã (www.newton.freitas.nom.br/artigos.asp?cod=107 - Acesso em: 25/03/2007).

3.1.3 - Características dos Efluentes das Indústrias de Cerveja e Refrigerantes

A determinação ou avaliação das características dos resíduos é fundamental. Assim, entre outras, deve-se conhecer de cada resíduo o teor de matéria orgânica, o teor de sólidos em suspensão e a concentração de substâncias tóxicas (VILLEN, 2001).

Em indústria de refrigerantes os efluentes são gerados na lavagem das salas da xaroparia, linhas de enchimento de latas e garrafas, pisos, descartes de produtos retornados de mercado e esgotos sanitários.

Os efluentes são ricos em açúcares, alguns corantes e outros componentes das bebidas. Apresentam também partículas de carvão oriundas da xaroparia e óleos minerais oriundos de vazamentos das máquinas de processo e das oficinas de manutenção.

No caso da utilização de soda cáustica para a lavagem de embalagens retornáveis, o efluente é alcalino podendo o pH atingir 12, a DQO é no máximo de 1.000 mgO₂/L. No caso da produção de embalagens descartáveis somente são gerados os efluentes das bebidas diluídas, ou seja, com pH ácido e a DQO pode atingir até 5.500 mgO₂/L.

O processo usual de tratamento desse efluente é constituído de três etapas: preliminar (remoção de areia, separação de água e óleo e peneiramento), primário (correção de pH) e secundário (reator anaeróbio seguido de lodos ativados).

Em cervejarias os efluentes são gerados na lavagem das salas de fermentação, linhas de enchimento de latas e garrafas, pasteurizadores, pisos, descartes de produtos retornados do mercado e esgoto sanitário da empresa.

Os efluentes são ricos em açúcares e outros componentes das cervejas. Os efluentes apresentam também partículas de terra diatomácea oriundas da filtração do mosto e óleos minerais oriundos de vazamentos das máquinas de processo e das oficinas de manutenção.

O pH do efluente normalmente apresenta tendência ácida ou neutra e a DQO pode atingir 2.000 mgO₂/L. O processo usual de tratamento desse efluente é constituído de

algumas etapas: preliminar (remoção de areia, separação de água e óleo, peneiramento e correção do pH), secundário por processo misto anaeróbio e aeróbio.

A etapa anaeróbia é composta de biodigestão em duas etapas sendo a primeira constituída por hidrólise ácida e a segunda pela etapa metanogênica. A eficiência complementar é obtida por processos aeróbios compostos por lagoa aerada ou lodos ativados. Secundário simples, pode ser composto somente de processo aeróbio, no caso os lodos ativados (GIORDANO, 2004).

A Tabela 1 mostra a possível origem das diversas substâncias contaminantes presentes no efluente de cervejaria.

Tabela 1: Substâncias contaminantes presentes no efluente de cervejarias (REINOLD,1997).

Ácidos graxos livres	Restos de produto (mosto, cerveja), agentes desinfetantes como o ácido acético.
Íons inorgânicos	Nitrito: processos microbiológicos (nitrato), contaminação da água bruta, restos de produto (mosto, cerveja), agentes de limpeza e desinfecção que contêm ácido nítrico. Iodeto: agentes de desinfecção (iodo, iodóforos). Fosfato: agentes de limpeza e desinfecção que contêm ácido fosfórico, agentes que impedem a formação de incrustações na lavadora de garrafas. Cloreto: contaminação da água bruta, restos de produto (mosto, cerveja), regeneração de trocadores catiônicos. Sulfato: contaminação da água bruta, restos de produto (mosto, cerveja), agentes de limpeza e desinfecção que contêm ácido sulfúrico.
Hidrocarbonetos clorados	Contaminação da água bruta, seção de oficinas (solventes), pintura, marcenaria, veículos.
Formas halogenadas	Contaminação da água da rede pública, formação através da desinfecção com cloro e desdobramento do cloro.
Umectante catiônico	Agentes de desinfecção que contêm umectantes catiônicos, aditivos para a soda cáustica da lavadora de garrafas, desinfecção de superfícies.
Ligações fenólicas e benzóicas	Contaminação da água bruta, substâncias contidas na matéria-prima cervejeira, conservação de produtos técnico-químicos (lubrificantes), agentes conservantes em colas, antioxidantes de solventes, produtos de reações (ex.: cloro), desinfecção manual de superfícies, produtos de limpeza caseiros, produtos para limpeza de sanitários.

3.1.4. Tratamento Biológico

Os processos biológicos de tratamento reproduzem em escala de tempo e área os fenômenos de autodepuração que ocorrem na natureza. Eles tem como objetivo remover a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, mediante a transformação desta em sólidos sedimentáveis (flocos biológicos) ou gases (RAMALHO, 1991).

Os esgotos e os efluentes industriais clarificados devido a remoção da matéria orgânica em suspensão (coloidal ou sedimentável) e dissolvida, bem como pela diminuição da presença de microrganismos, são considerados tratados. O grau de tratamento requerido é função da legislação ambiental, ou seja, das características ou pelo uso preponderante atribuído ao corpo receptor (FEEMA, 1992).

O processo de tratamento biológico é subdividido em dois grandes grupos, os aeróbios e os anaeróbios. Normalmente, os efluentes compostos de substâncias biodegradáveis (esgotos domésticos e de indústrias de alimentos) são preferidos nessas duas classes de processos. No ambiente aeróbio são utilizados equipamentos eletromecânicos para fornecimento de oxigênio utilizado pelos microrganismos, o que não é preciso quando o tratamento ocorre em ambiente anaeróbio.

Nos processos aeróbios de tratamento de efluentes são empregados microrganismos que para biooxidar a matéria orgânica utilizam o oxigênio molecular, O_2 , como receptor de elétrons. Normalmente há um consórcio de microrganismos atuando conjuntamente nos processos de estabilização da matéria orgânica. A microfauna é composta por protozoários, fungos, leveduras, micrometazoários e, sem dúvida, a maioria é composta por bactérias. Há grande variedade de sistemas aeróbios de tratamento de águas residuárias; as mais empregadas são lagoas facultativas, lagoas aeradas, filtros biológicos aeróbios, valas de oxidação, disposição controlada no solo e sem dúvida uma das opções mais utilizadas é o lodo ativado (GUIMARÃES, e NOUR, 2001).

Os biofiltros submersos tem sido utilizados por mais de 50 anos e parecem ser uma alternativa eficiente a outros processos de tratamento. Os microrganismos crescem no meio suporte, eliminando a necessidade da recirculação de lodo.

O biofiltro aerado submerso é constituído por um tanque preenchido com um material poroso, através do qual esgoto e ar fluem permanentemente. Na quase totalidade dos processos existentes, o meio poroso é mantido sob total imersão do fluxo hidráulico (VON SPERLING, 2005). O fluxo de ar no biofiltro aerado submerso é sempre ascendente, ao passo que o fluxo do líquido pode ser ascendente ou descendente. O biofiltro é portanto, um reator trifásico, segundo GONÇALVES (1996):

- fase sólida: constituída pelo meio suporte e pelas colônias de microrganismos que nele se desenvolvem sob a forma de biofilme;
- fase líquida: composta pelo líquido em permanente escoamento através do meio poroso;
- fase gasosa: formada pela aeração artificial e, em reduzida escala, pelos gases sub-produtos da atividade biológica.

Nos processos anaeróbios de tratamento de efluentes são empregados microrganismos que degradam a matéria orgânica presente no efluente, na ausência de oxigênio molecular. Nesse tipo de processo, a grande maioria de microrganismos que compõe a microfauna também é de bactérias, basicamente as acidogênicas e as metanogênicas. Como sistemas convencionais anaeróbios, os mais utilizados são os digestores de lodo, tanques sépticos e lagoas anaeróbias. Entre os sistemas de alta taxa, ou seja, aqueles que operam com alta carga orgânica, destacam-se os filtros anaeróbios, reatores de manta de lodo, reatores compartimentados e reatores de leito expandido ou fluidizado (GUIMARÃES e NOUR , 2001).

O filtro anaeróbio é um reator com biofilmes, apresentando alguma similaridade conceitual com os filtros biológicos percoladores aeróbios: em ambos os

casos, a biomassa cresce aderida a um meio suporte, usualmente pedras. No entanto, o filtro anaeróbio apresenta algumas importantes características e diferenças (VON SPERLING, 2005):

- o fluxo do líquido é ascendente, ou seja, a entrada é na parte inferior do filtro, e a saída na parte superior;
- o filtro trabalha afogado, ou seja, os espaços vazios são preenchidos com líquido;
- a carga de DBO aplicada por unidade de volume é bastante elevada, o que garante as condições anaeróbias e repercute na redução de volume do reator;
- a unidade é fechada.

A eficiência dos filtros biológicos é medida geralmente em termos de redução da DBO, que pode alcançar cifras da ordem de 70 a 80% de redução (VILLEN, 2001). Segundo VON SPERLING (2005), a eficiência dos filtros biológicos para tratar esgotos mais concentrados em matéria orgânica, é através da utilização de dois filtros em série.

A maioria das indústrias de bebidas requer algum grau de tratamento de efluentes, uma vez que são descartados em águas públicas (como rios), em estações de tratamento municipais, em seus próprios tratamentos aeróbios ou anaeróbios, ou em aplicações no campo.

Visto que a indústria de bebidas MALTA se localiza em perímetro urbano e, o emprego de tratamento anaeróbio aumentaria a possibilidade de geração de gases fétidos, a tecnologia de filtros biológicos aeróbios em série foi utilizada no projeto.

3.1.5 - Imobilização

Imobilização é um termo genérico usado para descrever a retenção da atividade biológica de um catalisador dentro de um reator ou sistema analítico. Os biocatalisadores, seja uma simples enzima, uma mistura delas ou enzimas contidas dentro de células vivas, estão confinados dentro de um suporte material.

As células microbianas imobilizadas como um sistema de multi-enzimas podem ser classificadas em três estados fisiológicos: viva em crescimento e morta. Assim, o estado mais adequado para aplicação a que se propõe deve ser selecionado. (CHIBATA, 1979).

O material imobilizado pode ser usado dentro de um reator através do qual o fluído passa continuamente. A imobilização tem por finalidade proporcionar material catalítico que pode mover-se repetidamente de um fluído para outro, convertendo substrato em produto, mediante uma reação enzimática controlada, facilitando a remoção do catalisador do produto que deixa o reator.

Os métodos usados para imobilização de células podem ser classificados em 3 categorias básicas, segundo CHIBATA et al. (1986):

- Imobilização física por suporte inerte: é baseada na ligação das células diretamente aos suportes insolúveis em água;
- Método da ligação transversal: a imobilização é feita através de ligações transversais intermoleculares obtidas por meio de reagentes bifuncionais ou multifuncionais;
- Método de aprisionamento por hidrogéis: as células são aprisionadas diretamente dentro de matrizes poliméricas, tais como alginato, pectina, etc.

Para MARGARITIS e MERCHANT (1984), células imobilizadas conferem propriedades desejáveis para um sistema biológico, as quais não são facilmente obtidas em processos de bateladas convencionais ou nos processos contínuos empregando células livres. Sistemas com células imobilizadas oferecem a possibilidade de maior concentração celular dentro do biorreator, resultando em maiores taxas de reação. Processos contínuos empregando células imobilizadas são menos susceptíveis aos efeitos inibitórios e esgotamento de nutrientes.

No tratamento de resíduos, em filtros e lodo ativado, as células imobilizadas também são muito utilizadas, constituindo uma técnica promissora. Segundo VILLEN (2001), o material de enchimento ideal para ser usado em filtros biológicos deve apresentar as seguintes características:

- elevado volume de vazios para garantir um adequado suprimento de oxigênio;
- elevada área superficial, para aumentar a quantidade de microrganismos presentes e conseqüentemente aumentar a capacidade de remoção de matéria orgânica;
- ser estruturalmente forte, o suficiente para suportar o seu próprio peso e mais o peso do limo que cresce aderido às suas paredes;
- ser suficientemente leve, para permitir reduções significativas nos custos das obras civis e para permitir construções mais altas que conseqüentemente ocupem menos área;
- ser biológica e quimicamente inerte;
- apresentar o menor custo possível por unidade de DBO removida.

A literatura traz, constantemente, informações de técnicas e processos, empregados na tentativa de solucionar o problema da carga poluente nas águas residuárias.

De acordo com SANTOS e MELO, 2006, as vantagens da argila expandida em relação aos meios de enchimento convencionais são:

- Excelente controle da permeabilidade hidráulica associada a elevadas áreas específicas de suporte para a imobilização de organismos;
- O isolamento térmico proporcionado pela argila expandida, permite melhor eficiência dos processos biológicos degradativos em períodos de temperatura ambiente baixas;
- A argila expandida é um meio de enchimento leve, o que se traduz em economia em termos de logística;
- Apresenta capacidade elevada para a remoção de fósforo;
- Os materiais de argila expandida são recomendados na horticultura como fertilizante que, com o teor adicional de fósforo, torna-o ainda mais valioso resultando numa reciclagem biológica de um recurso limitado, que em outras condições poderia ser considerado poluente.

Assim, diante das informações obtidas, esta pesquisa visa empregar o efluente da indústria de bebidas MALTA na busca de soluções, para diminuir a carga orgânica empregando células imobilizadas em argila expandida e reatores acoplados em sistema de fluxo contínuo.

3.1.6. - Métodos Normalmente Utilizados na Determinação da Carga Poluidora de Efluentes Industriais

3.1.6.1 Ensaios para determinação da carga orgânica

No projeto de uma estação de tratamento, normalmente não há interesse em se determinar os diversos compostos dissolvidos na água residuária. Isto não só pela dificuldade em se executar vários destes testes em laboratório, mas também pelo fato dos resultados não serem diretamente utilizáveis como elementos de projeto e operação. Assim, é preferível a utilização de parâmetros indiretos, que traduzam o caráter ou o potencial poluidor do despejo em questão. Tais parâmetros definem a qualidade dos esgotos, podendo ser divididos em três categorias: parâmetros físicos, químicos e biológicos (VON SPERLING, 2005). Uma das análises mais recomendadas é a do carbono orgânico total (COT). Este pode estar presente em material biodegradável ou não. Para quantificar as concentrações de matéria orgânica total e de matéria orgânica biodegradável normalmente são realizadas as determinações da DQO e da DBO₅, respectivamente.

A DQO é, por definição, a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação da matéria orgânica da amostra através de dicromato de potássio em meio ácido na presença de catalisadores (VILLEN, 2001).

Para determinação da DQO a técnica de micro digestão, descrita por JIRKA e CARTER (1975), vem sendo utilizada em indústrias. Para complementar este método efetua-se uma medida espectrométrica automatizada da aparição de Cromo +3 após digestão da amostra. Para medir o valor da DQO na concentração de 3-900mg/L a sensibilidade adequada é possível de ser obtida em comprimento de onda de 600 nm, por

meio do uso de uma célula de 50 mm. O método semi-automatizado é comparado ao método padrão no que diz respeito a precisão, exatidão, facilidade de análise e comparação dos dados.

A DBO, por definição, é a quantidade de oxigênio requerida pela unidade de volume de um resíduo, para a estabilização biológica da matéria orgânica biodegradável (normalmente determinada após 5 dias de incubação a 20 °C), mediante o uso de microrganismos vivos ou de suas enzimas (VILLEN, 2001). Esse teste também é empregado para medir o oxigênio utilizado na oxidação de formas reduzidas do nitrogênio (demanda de nitrogênio), se isto não for evitado pelo uso de um inibidor (GREENBERG *et al.*, 1992).

3.1.6.2 Ensaios de Toxicidade

A prática de utilização de ensaios de toxicidade em águas residuárias no Canadá, E.U.A., França e Alemanha, vem de longa data. No Brasil esta prática iniciou-se na década de 80 (ORTOLANO, 1994).

O controle do desempenho dos sistemas de tratamento de efluentes é monitorado, convencionalmente, por medidas indiretas não específicas de carbono orgânico, como DBO, DQO, COT e OD (oxigênio dissolvido). Na atualidade, novas exigências ambientais passaram a incluir também, a remoção de constituintes orgânicos voláteis e substâncias tóxicas presentes em baixas quantidades (ECKENFELDER, 1991).

O estudo dos efeitos biológicos que os compostos químicos possam causar, mesmo em baixas concentrações, é de suma importância para se evitar maiores impactos

ambientais. Os ensaios de toxicidade são utilizados para detectar e avaliar a capacidade inerente de um agente tóxico em produzir efeitos deletérios a organismos – teste.

Os ensaios de toxicidade avaliam o efeito do efluente como um todo ou através de substâncias específicas que o compõem; estas abordagens permitem avaliar os efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos. Os efeitos da toxicidade podem ser distinguidos em efeitos agudos, sendo responsáveis por uma resposta severa e rápida como a morte dos organismos ou efeitos crônicos, traduzidos por resposta a um estímulo contínuo de longo tempo, que pode abranger todo o ciclo de vida dos organismos, tendo efeitos sub-letais que modificam uma ou várias funções biológicas (CETESB, 1990 a).

Na avaliação dos efeitos agudos dos agentes tóxicos em testes de toxicidade, geralmente utiliza-se a concentração letal (CL50) ou a concentração efetiva (CE50) a 50% dos organismos em teste. Essa resposta é considerada a mais significativa para ser analisada frente a uma população.

A escolha de um organismo-teste é um dos aspectos mais importantes em um ensaio de toxicidade e alguns dos critérios utilizados são: facilidade na manipulação e tratamento; facilidade de padronização, as condições que provocam respostas são bem conhecidas; facilidade de avaliação das respostas; possibilidade de avaliação estatística das respostas (LANDIS e YU, 1995).

Tradicionalmente, o nível de agentes tóxicos em águas e efluentes é estimado mediante bioensaios com peixes e macroinvertebrados. Entretanto, para a determinação da toxicidade de um efluente devem-se utilizar organismos de diferentes níveis tróficos do ambiente aquático como algas, microcrustáceos e bactérias (CETESB, 1990 b).

Observações em trutas evidenciaram que os efluentes alimentícios, têxteis e de madeira, chegam a ser mais tóxicos que os de mineração, indústrias químicas e alguns setores de refinaria (BLAISE e COSTAN, 1987).

Recomenda-se que a eventual presença de substâncias tóxicas no efluente seja resolvida na fonte. As lagoas têm demonstrado suportar cargas elevadas de substâncias tóxicas, principalmente se não são lançadas bruscamente. Isto deve-se à ocorrência de um período de aclimação dos microrganismos presentes nas lagoas de tratamento (CETESB, 1989).

Segundo SAPIA e MORITA (2002), apesar da carga poluidora ser importante na avaliação da capacidade do sistema público de tratamento de esgotos, nem sempre um baixo valor significa que o efluente não causará problemas ao sistema. Deve-se buscar um critério de avaliação de toxicidade e não somente a carga orgânica. Dentre os testes de toxicidade, comumente utilizados como critérios de recebimento de efluentes não domésticos em sistemas públicos de esgotos, os autores citam o bioensaio com rotíferos.

Segundo a sua composição, alguns efluentes podem ser tóxicos apenas a alguns tipos de peixes, ou a microcrustáceos ou até mesmo a ambos organismos. Sendo assim, é recomendável sempre que possível, a utilização de mais de uma espécie para avaliação do efeito de um efluente sobre o ecossistema aquático. Logo o organismo mais sensível fornecerá maior segurança sobre o impacto que este efluente possa causar no corpo receptor (CETESB, 1990 a).

3.1.6.3 Determinação de nitrogênio amoniacal total

Na biodegradação de aminoácidos e proteínas (matéria orgânica nitrogenada), em processos biológicos de tratamento de esgotos, ocorre a conversão destes em compostos mais simples como amônia, nitrato, nitrito e nitrogênio molecular. Esse mecanismo é efetuado em etapas distintas por grupos diferentes de microrganismos. Uma primeira etapa é a conversão de nitrogênio orgânico em amônia pela ação de bactérias heterotróficas sob condições aeróbias ou anaeróbias.

O grupo das bactérias *Nitrossomas* convertem a amônia para nitrito, necessariamente sob condições aeróbias. O nitrito por sua vez é oxidado até nitrato pelo grupo das bactérias *Nitrobacter*.

Pode-se estimar se houve despejo de esgoto doméstico em um corpo aquático analisando-se as várias formas do nitrogênio: se o aporte do resíduo foi recente, certamente a maior fração do nitrogênio total será o nitrogênio orgânico ou mesmo na forma de amônia, indicando que a matéria orgânica ainda não foi oxidada. No entanto, se for um lançamento antigo, e evidentemente se o meio for aeróbio, a espécie mais significativa, dentre todas, será o nitrato, a forma mais oxidada. Por outro lado, se uma grande proporção de nitrogênio estiver na forma intermediária de oxidação, o nitrito, isso pode significar que a matéria orgânica encontra-se ainda em processo de estabilização (GUIMARÃES e NOUR, 2001).

Em soluções aquosas, a amônia é encontrada em duas formas, o íon amônio (NH_4^+) e a amônia não-ionizável (NH_3). Estas formas são intercambiais e juntas recebem a denominação de amônia total. O nitrogênio na forma de amônia livre (NH_3) é tóxico aos

organismos aquáticos e suas concentrações dependem principalmente da temperatura, pH e da concentração de amônia total nos corpos d'água (REIS e MENDONÇA, 1995).

Segundo BLAINE (1992), amônia e pH são interdependentes, pois a amônia livre (NH_3) e o íon amônio (NH_4^+) têm seu equilíbrio afetado pelo pH. Em pH 7 e abaixo deste, o NH_4^+ está presente quase que exclusivamente nesta forma; enquanto que em pH 9 e acima deste, predomina a forma NH_3 . Quando a decomposição é intensa o pH pode elevar-se, o NH_3 permanece volátil, sendo mais tóxico (comparado ao NH_4^+) e pode formar produtos estáveis com a matéria orgânica por reação com açúcares, carboxil, carbonil, fenólicos, hidroxil, quinona e outros compostos insaturados.

De acordo com a legislação federal em vigor, a Resolução CONAMA nº 357 (2005) do Ministério do Meio Ambiente, o padrão de lançamento para o nitrogênio amoniacal total é de 20,0 mg /L N. O nitrogênio amoniacal é padrão de classificação das águas naturais e padrão de emissão de esgotos. A amônia é um tóxico bastante restritivo à vida dos peixes, sendo que muitas espécies não suportam concentrações acima de 5 mg/L. Além disso, a amônia provoca consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais ao ser oxidada biologicamente, a chamada DBO de segundo estágio. Por estes motivos, a concentração de nitrogênio amoniacal é importante parâmetro de classificação das águas naturais e normalmente utilizado na constituição de índices de qualidade das águas.

3.1.6.4 Temperatura e pH

A temperatura tem grande influência no metabolismo microbiano, afetando as taxas de oxidação da matéria carbonácea e nitrogenada. Em termos gerais, as taxas da maioria das reações físicas, químicas e biológicas aumentam com a temperatura. Elevações

da temperatura diminuem a solubilidade dos gases (ex: oxigênio dissolvido e gás carbônico), e aumentam a taxa de transferência de gases (o que pode gerar mau cheiro, no caso da liberação de gases com odores desagradáveis).

Nas reações químicas, a velocidade de reação dobra para cada aumento de 10 °C na temperatura do meio, proporcionada pelo incremento do contato entre as moléculas dos reagentes. Nas reações biológicas, a tendência de aumento das taxas mantém-se até a temperatura ótima; acima desta a taxa decresce devido, provavelmente, à destruição de enzimas nas temperaturas mais elevadas (SAWYER e CARTY, 1978).

As velocidades de reação nos processos aeróbios são suficientemente elevadas em temperaturas ambientes de 15 a 30 °C, sendo que as bactérias responsáveis pelo processo não são especialmente sensíveis a variações nessa faixa, não havendo, portanto, necessidade de aquecimento. Nos processos anaeróbios existe a necessidade de aquecimento para se obter elevadas velocidades de reação, com exceção dos filtros anaeróbios (VILLEN, 2001).

A adaptação dos microrganismos a mudanças súbitas de temperatura parece ser lenta em temperaturas mais elevadas. WINKLER (1981) observou que são necessários vários meses para a aclimação da biomassa a uma mudança de 5 °C na faixa de temperatura de 15 °C.

HOILJOKI *et al.* (2000) avaliaram o efeito da baixa temperatura no processo de nitrificação com pós-tratamento anaeróbio em lixiviado de “landfarm” de lodo, através de dois processos: reator com lodo ativado e reator com lodo ativado fixado em material plástico como suporte. Ambos os reatores foram operados as temperaturas de 10, 7 e 5 °C, com aeração contínua ($> 2 \text{ mg O}_2/\text{L}$) e tempo de retenção hidráulico de 3 dias. Foram analisados Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio

(DBO), nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e fósforo. Durante os 35 primeiros dias a concentração inicial de amônia variou de 80 a 150 mg NH_4 - N/L, com diminuição de 90 %, devido a nitrificação em ambos os reatores à temperatura de 10 °C. Depois de 35 dias com amônia inicial de 130 – 190 mg NH_4 N/L, a diminuição foi de 99 %. Quando a temperatura abaixou para 7 °C, a diminuição da concentração de amônia foi de 93 % e a 5 °C a diminuição foi de 61 %. Embora o fato possa ser relacionado com a temperatura, ocorreram também mudanças na qualidade do lodo. Os autores constataram ainda, que a concentração de oxigênio diminuía significativamente quando ocorria eficiente diminuição da concentração de amônia. Esta reação tem elevado consumo de oxigênio.

O potencial hidrogeniônico representa a concentração de íons hidrogênio H^+ (em escala antilogarítmica), dando uma indicação sobre a condição de acidez, neutralidade ou alcalinidade da água. Os valores de pH afastados da neutralidade podem afetar a vida aquática e os microrganismos responsáveis pelo tratamento biológico das águas residuárias.

A alcalinidade representa a quantidade de íons na água que reagirão para neutralizar os íons hidrogênio. É uma medição da capacidade tampão da água. Os principais constituintes da alcalinidade são os bicarbonatos, carbonatos e os hidróxidos. A distribuição entre as três formas na água é função do pH. Os processos oxidativos (como a nitrificação) tendem a consumir alcalinidade, a qual, caso atinja baixos teores, pode dar condições a valores reduzidos de pH, afetando a própria taxa de crescimento dos microrganismos responsáveis pela oxidação (VON SPERLING, 2005).

Muitos estudos foram realizados procurando conhecer a influência do pH na taxa de nitrificação. Contudo, muitos trabalhos evidenciam que diminuindo o pH, o mesmo ocorre com a taxa de nitrificação. Esta tendência acontece tanto para microrganismos aclimatados como para os não aclimatados. SANTIAGO (1994) observou que quando

ocorrem variações abruptas no pH em sistemas de reatores, a nitrificação é retomada após curto período de tempo, indicando que o pH tem efeito inibitório e não tóxico.

FERREIRA (2000) sugere que para a implantação de projetos é importante manter o pH entre pH 6,5 e pH 8,0; assegurando assim a estabilidade da condição operacional.

A amônia tem caráter alcalino; portanto, a conversão de amônia a nitrato está ligada a acidificação do meio causando solubilização de metais segundo STOLP (1988).

O efeito de diferentes valores de pH sobre a nitrificação tem sido estudado em biofiltros submersos, com o objetivo de assegurar o pH ótimo em torno de 7,5 a 8,5, para oxidação de amônia e máxima acumulação de nitritos em biofilmes de microrganismos nitrificantes nos reatores (DINÇER E KARGI, 2000).

3.1.6.5 Oxigênio dissolvido

Segundo VILLEN (2001), a condição mais importante para o bom andamento de um processo biológico aeróbio é o fornecimento de oxigênio suficiente para a respiração microbiana ($O_2 > 2 \text{ mg L}^{-1}$). Valores elevados de oxigênio dissolvido (OD) devem ser mantidos nos sistemas de aeração para garantir que em pontos de acesso difícil do oxigênio, exista concentração superior à crítica.

Estudos recentes sugerem que a concentração de OD no líquido deve ser mantida a 70% da concentração de saturação. A nitrificação, sendo um processo estritamente aeróbio, depende da concentração de oxigênio dissolvido. O oxigênio dissolvido em um reator é um pré-requisito indispensável para a ocorrência da nitrificação;

pois tem significativo efeito na velocidade de crescimento das bactérias nitrificantes nos sistemas de tratamento biológico de efluentes.

FERREIRA (2000) propôs consumo de 4,6 mg O₂/L de nitrogênio amoniacal oxidado; maior, portanto, do que a quantidade necessária para a oxidação da matéria orgânica. Taxas e velocidades ótimas do processo de nitrificação podem ser obtidas em níveis de OD da ordem de 4,0 mg O₂/L, desde que exista uma população ótima de bactérias nitrificadoras.

3.1.6.6 Turbidez e Sólidos

A turbidez é um parâmetro muito utilizado no controle da operação das estações de tratamento de água, pois representa o grau de interferência com a passagem da luz através da água, conferindo aparência turva à mesma. Em água com turbidez igual a 10 uT, ligeira nebulosidade pode ser notada; com turbidez igual a 500 uT, a água é praticamente opaca (VON SPERLING, 2005).

Segundo QUASIM (1985), a turbidez é causada por uma grande variedade de sólidos em suspensão. Em corpos d'água pode diminuir a penetração da luz, prejudicando a fotossíntese. Desta maneira haverá prejuízos, por exemplo em tratamentos realizados em lagoas facultativas, onde o oxigênio requerido pelas bactérias aeróbias é fornecido pelas algas.

A qualidade do tratamento aplicado às águas naturais e residuárias está diretamente relacionada às diversas substâncias nelas existentes, seja pela variedade, seja pela quantidade destas substâncias.

Quando há interesse apenas em quantificá-las, um dos procedimentos analíticos que deve ser executado é a determinação de sólidos. Os dados de sólidos têm importância para o acompanhamento na eficiência dos sistemas de tratamento para águas naturais e residuárias.

De acordo com a legislação federal em vigor, a Resolução CONAMA nº 357 (2005), do Ministério do Meio Ambiente, a condição de lançamento para materiais sedimentáveis é de até 1 mL/L em teste de 1 h em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes.

Os efluentes industriais clarificados devido à remoção da matéria orgânica em suspensão (coloidal ou sedimentável) e dissolvida, bem como pela redução da presença de microrganismos, são considerados tratados.

3.1.6.7 Condutividade

A condutividade está relacionada à concentração de sais solúveis nos efluentes e representa uma medida indireta da concentração de poluentes, predominantemente os inorgânicos. A presença excessiva de sais, mesmo sais inertes tais como o cloreto de sódio pode retardar ou inviabilizar os processos biológicos (GRADY Jr. *et. al.*, 1980), por efeito osmótico. Em casos extremos podem inviabilizar o uso das águas por salinização. Em geral níveis superiores a 100 uS/cm indicam ambientes impactados. Em águas de rios classe II, não poluídas, a condutividade média é ao redor de 75 uS/cm (Rio Jaguari e o Rio Atibaia, mais eutrofizado, 209 uS/cm).

3.1.6.8 Fósforo (P)

A presença de fósforo (P) na água está associada aos sólidos em suspensão e aos sólidos dissolvidos (provenientes da dissolução de compostos do solo e decomposição da matéria orgânica). Trata-se de um nutriente essencial para o crescimento dos microrganismos, participando da formação das membranas celulares e geração de energia biológica. Entretanto, quando em elevadas concentrações, o fósforo pode conduzir a um crescimento exagerado desses organismos induzindo eutrofização. (VON SPERLING, 2005).

Nos efluentes industriais estão presentes em produtos de limpeza, como por exemplo os detergentes, e podem ser originados de proteínas, aminoácidos ácidos fosfóricos e seus derivados. Em lançamentos de efluentes, a montante de represas com problemas de eutrofização freqüentemente, o P é limitado a um total de 1,0 a 2,0 mg/L (VON SPERLING, 2005).

A argila expandida, utilizada como suporte para a imobilização dos microrganismos, é um material fino, granulado e filtrante com uma elevada área de superfície e com capacidade elevada para a remoção do fósforo. O fósforo é eliminado tanto por precipitação a pH elevado como por atrações e ligações físico-químicas, capturado e acomodado no filtro (SANTOS e MELO, 2006).

3.1.6.9 Identificação dos microrganismos

Os principais organismos presentes em despejos são protozoários, fungos, algas e as bactérias. Essas constituem o grupo de maior importância em sistemas de tratamento

biológico. As principais bactérias responsáveis na remoção da DBO são as heterotróficas. Este grupo, segundo VON SPERLING (1996), é subdividido em outros dois:

a) Organismos quimioautótrofos: Utilizam a matéria inorgânica como fonte de energia e o CO_2 como fonte de carbono. Estão ligados à nitrificação.

b) Organismos quimioheterótrofos: Utilizam a matéria orgânica como fonte de energia e fonte de carbono. São responsáveis pela maior parte das reações ocorridas no tratamento biológico.

Nos despejos domésticos, podem ser encontradas bactérias aeróbias, anaeróbias e facultativas, a seguir:

Bactérias aeróbias: São as que retiram o oxigênio contido no ar, oriundo diretamente da atmosfera ou dissolvido na água para seu metabolismo. Essa ação bacteriana é denominada de oxidação ou decomposição aeróbia.

Bactérias anaeróbias: São as que retiram o oxigênio dos compostos orgânicos ou inorgânicos que contêm oxigênio para seu metabolismo, ao invés de retirá-lo do ar. Este processo bacteriano é denominado de putrefação ou decomposição anaeróbia.

Bactérias facultativas: São as que possuem a capacidade de ora retirar o oxigênio contido no ar, ora retirar o oxigênio através de ações sobre outros compostos.

A reprodução bacteriana ocorre, basicamente, por fissão binária, onde cada célula ao atingir certo tamanho, divide-se em duas novas células. Na prática, naturalmente, o crescimento é logo restringido devido à exaustão de nutrientes no meio. (VON SPERLING, 1996). Além das características metabólicas, as bactérias possuem a capacidade de flocular (aglutinam-se e formam flocos), quando entram na fase de declínio em seu crescimento.

Em efluentes ricos em matéria orgânica, as bactérias e protozoários apresentam crescimento disperso. A medida que a energia (matéria orgânica) vai sendo consumida durante o tratamento do efluente, ocorre aglomeração das bactérias, pois já não existe tanta energia para que elas gastem em deslocamento, formando um floco. Além disso forma-se também zooglêa (gelatina com característica adesiva) ao redor da membrana celular das bactérias, conferindo peso ao floco que causa sua decantação. Esta é a condição ideal para se alcançar melhor eficiência do tratamento.

Segundo YIANNAKOPOULOU (1998) os protozoários podem exercer um papel muito importante no tratamento biológico de efluente de celulose, além de indicarem mudanças na carga tóxica de efluente a ser tratado. Os protozoários são predadores que “limpam” o efluente, removendo o excesso de bactérias que se encontra em suspensão (NEOTEX, 1997), podem também absorver matéria orgânica do meio nos casos em que a concentração for elevada. Entretanto são extremamente sensíveis a efluentes tóxicos e com baixa oxigenação.

A análise do DNA modificou a face da Microbiologia. Antes que as técnicas de Biologia Molecular fossem largamente utilizadas, os métodos para identificar espécies bacterianas tinham poder de resolução bastante limitado: podíamos observar a forma das colônias que cresciam em uma placa de Petri, examinar o formato de cada célula sob o microscópio ou recorrer a análises bioquímicas relativamente simples como o método de Gram, pelo qual as espécies são classificadas como “negativas” ou “positivas” dependendo das características da parede celular. Com o seqüenciamento do DNA, os microbiologistas passaram subitamente a dispor de um fator de identificação perceptível e definitivamente diferente em cada espécie. Mesmo espécies que não podem ser cultivadas em laboratório (pela dificuldade de reproduzir suas condições naturais de crescimento, como no caso das

criaturas que habitam o fundo do oceano) se prestam à análise do DNA, desde que uma amostra possa ser coletada das profundezas (WATSON & BERRY, 2005).

Diversos trabalhos têm sido publicados com o objetivo de identificar gêneros e espécies de microrganismos utilizando marcadores moleculares específicos. O advento da Biologia Molecular e da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) tornou possível identificações rápidas e precisas de microrganismos isolados de seus ambientes naturais. A eficiência desta metodologia está associada ao *desenho* de *Primers* espécie-específicos com base em seqüências depositadas em bancos de dados genômicos.

Como visto no item objetivos, o presente trabalho tem também a finalidade de, através de métodos moleculares, verificar quais as comunidades microbianas responsáveis pelo tratamento do efluente nos biorreatores.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material

4.1.1 - Efluente industrial

Foram utilizadas amostras provenientes da saída do tratamento de efluentes líquidos da indústria de bebidas MALTA. Localizada no município de Assis/SP, esta iniciou suas atividades em 1956, sendo atualmente uma das 5 maiores indústrias do centro-oeste paulista. Comercializa cerveja tipo *pilsen*, *malzibier*, *lager* e refrigerantes tipo cola, guaraná, limão, tutti-frutti e laranja. Possui capacidade para processar 250.000 litros de cerveja e 200.000 litros de refrigerantes por dia. Em capacidade total de produção, gera 40 m³ de efluente por hora que passa por um tratamento preliminar (remoção de sólidos

flutuantes, equalização, controle de temperatura e pH). Este é descartado na rede pública de esgotos e tratado na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) da SABESP local.

4.1.2 - Microrganismos

Foram utilizadas culturas bacterianas, obtidas de diferentes pontos da ETE (Figura 1) da SABESP localizada em Assis/SP.



Figura 1. Foto aérea da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Cia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP/Assis - (A = lagoas anaeróbias; F = lagoas facultativas).

4.1.3 - Meios de cultura para bactérias

- Meio para preservação de culturas bacterianas: Nutriente Ágar (pH: 7-7,5)

- Meio para ativação das culturas: Efluente enriquecido com melaço (pH: 7-7,5)
- Meio para plaqueamento e avaliação das Unidades Formadoras de Colônias – UFC/mL: Plate Count Agar (pH: 7-7,5)

4.1.4. Efluente industrial

Foi utilizado o efluente, coletado na saída do tratamento de efluentes, da indústria de bebidas MALTA (Figura 2), para avaliar a diminuição da toxicidade, DBO, DQO, SS, nitrogênio amoniacal total, fósforo (P), turbidez e condutividade.



Figura 2. Ponto de coleta na saída do efluente do sistema de tratamento da indústria.

4.2- Métodos

4.2.1. - Imobilização de células

Foram utilizados, para o crescimento dos microrganismos, biorreatores preenchidos com argila expandida previamente lavada, mantidas submersas com auxílio de discos plásticos perfurados. Posteriormente, foi adicionado o inóculo bacteriano, contendo cerca de 10^7 células (UFC/mL).

A seguir, para a ativação e crescimento das bactérias no suporte, o sistema foi alimentado a intervalos de 12 h com o efluente enriquecido com 3% de melaço e 0,5% de extrato de levedura. Os experimentos foram iniciados, no sistema de quatro reatores, em fluxo contínuo (Figura 3), após 3 meses de estabilização. Utilizou-se como parâmetro para verificar a adequada imobilização dos microrganismos no suporte a redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e da Demanda Bioquímica de Oxigênio do efluente (DBO).

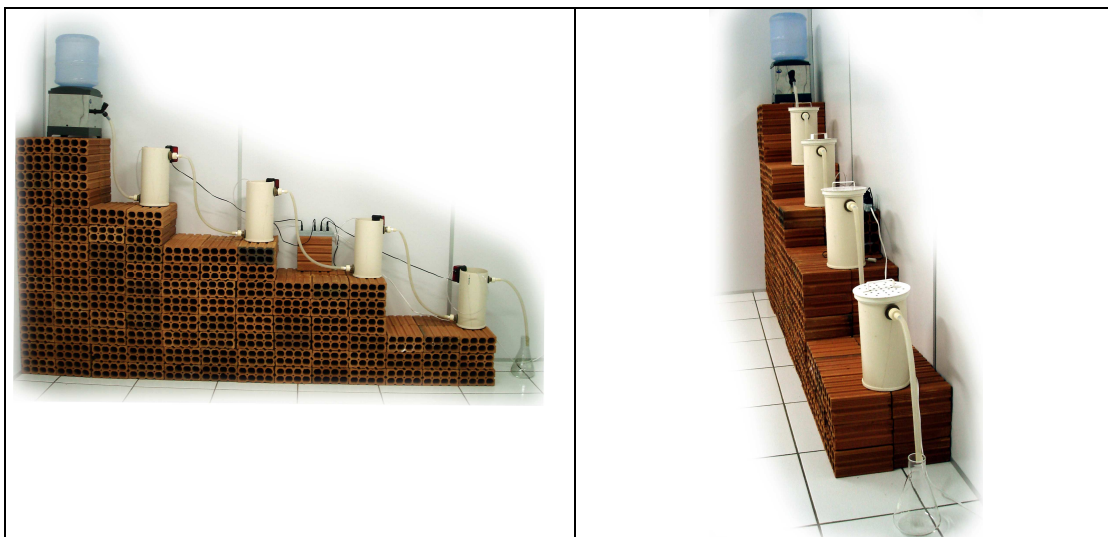


Figura 3. Sistema de reatores para experimento em fluxo contínuo (dimensões unitárias: volume - 4.000 mL, altura - 26 cm, diâmetro - 14,5 cm).

4.2.2. Avaliação do efluente em fluxo contínuo com células imobilizadas em argila expandida

Nos reatores, foram realizados experimentos em diferentes vazões e tempos de retenção hidráulica / h. Para obtenção dos tempos de retenção hidráulica / h de 1,9; 3,6; 4,15 e 10,28 as vazões correspondentes foram de 3157,9; 1666,6; 1445,7 e 583,6, respectivamente em volumes fixos de 6.000 mL de amostra coletada.

Em concordância com HIRAKAWA *et al.* (2002), cerca de 54% do volume interno do reator (859 g) foi preenchido com argila expandida.



Figura 4: Argila expandida quebrada para a utilização, como suporte nos biofiltros.

Os reatores foram interligados na parte inferior, responsável pela entrada do fluxo de líquido e na parte superior á saída. No início de cada experimento os reatores foram alimentados por gravidade com o efluente bruto da indústria. Para proceder o experimento em aerobiose, o sistema foi mantido aberto com injeção de ar constante (através de bombas de injeção de ar marca SARLOBETTER, modelo 160). Na saída do quarto reator foi colocado um frasco coletor de amostra. Nas amostras, coletadas nos tempos de retenção hidráulica / h 1,9, 3,6, 4,15, 10,28 foram realizadas as dosagens de nitrogênio amoniacal total, DBO, DQO, sólidos sedimentáveis, condutividade, turbidez, ensaios de toxicidade, pH, OD, contagem bacteriana e a temperatura (T^0) dos reatores.

4.2.3 - Coleta e preservação das amostras

Por não ocorrerem bruscas variações na composição das amostras, devido ao tratamento preliminar do efluente na indústria, as mesmas foram coletadas diariamente e de forma simples (volume de efluente coletado em amostra única e ao acaso, proporcional à vazão do efluente). A seguir, quando necessário, as amostras foram acondicionadas em

frascos plásticos, conservadas em freezer, e descongeladas a temperatura ambiente antes de sua utilização.

4.2.4 - Preparação do inóculo

Foram misturados 500 mL de cada uma das amostras coletadas, em pontos próximos à superfície, nas lagoas facultativas da Estação de Tratamento de Esgoto da SABESP local. Acrescentou-se à mistura 0,1% de glicose, 0,1% de extrato de levedura e 0,02% de fosfato de potássio (CONEGLIAN, 2001). As misturas assim preparadas foram transferidas aos reatores e incubadas à temperatura ambiente. Foi injetado ar no meio para induzir o crescimento das bactérias aeróbias.

4.3. - Análises físico-químicas do efluente

4.3.1. Avaliação do pH, OD e temperatura (T°)

Diariamente o pH, a T° e o OD foram verificados na amostra do efluente que abasteceu o sistema, nos quatro reatores e na amostra do efluente após o tratamento, através de leituras diretas com auxílio de pHmetro (marca LUTRON), oxímetro (marca YSI, modelo 95) e termômetro portáteis.

4.3.2. Avaliação da DBO

Para as análises de DBO, o método HACH foi utilizado para amostras coletadas diariamente na saída do quarto reator e na amostra de efluente inicial que abasteceu o sistema.

4.3.4. Avaliação da DQO

As análises de DQO foram feitas empregando-se o método de refluxo fechado colorimétrico, ampolas AQUALITY, nas amostras coletadas diariamente na saída do quarto reator e na amostra de efluente inicial, que abasteceu o sistema.

4.3.5. Avaliação da turbidez

A turbidez foi analisada mediante leituras diretas em turbidímetro (marca POLICONTROL, modelo AP – 2000), expressos em Unidade Nefelométrica de Turbidez (NTU) nas amostras coletadas diretamente na saída do quarto reator e na amostra de efluente inicial, que abasteceu o sistema.

4.3.6. Avaliação de sólidos sedimentáveis

Os sólidos sedimentáveis, existentes em 1 L de amostra foram determinados, em cone Imhoff por ação da gravidade em teste de 1 h nas amostras coletadas diretamente na saída do quarto reator e na amostra de efluente inicial, que abasteceu o sistema.

4.3.7. Dosagens de Fósforo

O fósforo foi analisado utilizando o método gravimétrico (digestão nitro-perclórica e precipitação com quimociac), nas amostras coletadas diretamente na saída do quarto reator e na amostra de efluente inicial, que abasteceu o sistema.

4.3.8. Condutividade

A condutividade foi analisada mediante leituras diretas em condutivímetro (marca METTLER TOLEDO, modelo MC 226) expressas em microsiemens/cm (uS/cm), nas amostras coletadas diretamente na saída do quarto reator e na amostra de efluente inicial, que abasteceu o sistema.

4.3.9. Avaliação do nitrogênio amoniacal total

As dosagens da $[NH_3]$ foram efetuadas mediante a utilização do eletrodo íon-seletivo, que se baseia na difusão do NH_3 por uma membrana hidrofóbica gás permeável, que separa a solução a ser analisada do sistema interno do eletrodo seletivo. A amônia dissolvida difunde-se através da membrana e altera o pH da solução interna do eletrodo de pH, combinado com um eletrodo de referência Ag (AgCl, KCl). A concentração do íon cloreto não varia dentro do eletrodo de amônia, portanto, seu potencial mantém-se constante e funciona como um eletrodo de referência. As dosagens de amônia foram realizadas nas amostras coletadas diretamente na saída do quarto reator e na amostra de efluente inicial, que abasteceu o sistema.

4.3.10. Quantificação das bactérias

Amostras do inóculo foram coletadas diariamente dos reatores e da saída do sistema. A seguir, essas foram suspensas em solução NaCl 0,85% e as bactérias avaliadas quantitativamente pelo método de diluição em série seguida de plaqueamento, empregando-se o meio PCA e a técnica “pour plate”. As placas foram incubadas a 36 °C durante 48 h.

4.3.11. Avaliação da toxicidade

Foram empregadas duas espécies de organismos-teste para os ensaios de toxicidade aguda do afluente e efluente do reator: o microcrustáceo *Daphnia similis* seguindo as recomendações da Norma CETESB L5.018 e sementes de alface (*Lactuca sativa*), segundo o manual de métodos do National Water Research Institute (DUTKA, 1989).

Para a metodologia com o microcrustáceo (esquema básico apresentado na Figura 5), os organismos-teste foram submetidos a diferentes concentrações do agente tóxico durante 48 h a temperatura de 20 °C, na ausência de luz.

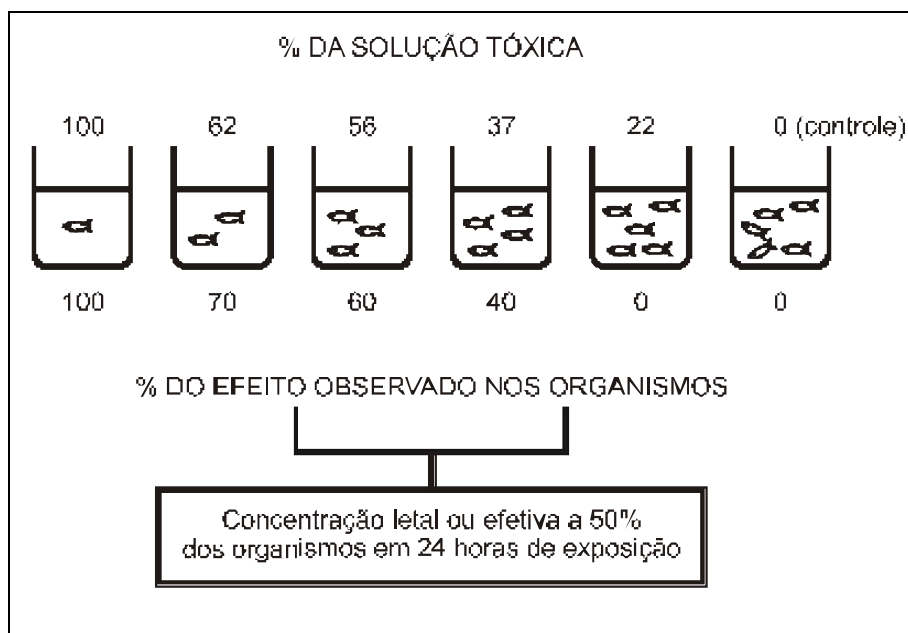


Figura 5. Esquema básico de um teste de toxicidade. Fonte: CETESB, (1992).

Foram utilizadas *Daphnias* com idade entre 6 e 24 h, obtidas de fêmeas adultas separadas na véspera. Para cada amostra foram testados 5 organismos.

Um controle de acompanhamento do teste com solução referência dicromato de potássio na concentração 0,04 a 0,17 mg/L avaliou a sensibilidade do microcrustáceo.

No decorrer dos experimentos, as amostras de efluente inicial (a cada troca de efluente), que abasteceu o sistema e amostras coletadas na saída do quarto reator foram avaliadas quanto à possível diminuição da toxicidade determinada através da CL50 (concentração letal a 50% da população).

Após 48 h os testes foram submetidos à leitura com contagem de organismos imóveis em cada tubo. Os dados CE_{50} ; 48 h foram transformados em Unidades Tóxicas (U.T) onde $U.T. = 100 / CE_{50}$; 48 h. Na análise estatística foi utilizada a rotina MGLH (Multivariate General Linear Hypothesis) do pacote estatístico SYSTAT (WILKINSON, 1988).

Para o teste de toxicidade com sementes de alface, o material obtido dos experimentos foi filtrado através de membrana Millipore 0,22 µm e diluído nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125, e 1,56 % em água destilada e 2 mL de cada solução foi utilizada para embeber discos de papel de filtro colocadas no interior de placas de poliestireno (9 cm φ). Para controle positivo de toxicidade foi empregado 2 mL de NaCl (5 g/L) e para controle negativo, água destilada.

Foram colocadas em cada placa 20 sementes de alface e essas foram incubadas em temperatura ambiente, envoltas em papel alumínio por 48 h. A avaliação do tamanho das raízes germinadas foi realizada com auxílio de papel milimetrado (DUTKA,B.J,1989).

A porcentagem de variação de crescimento foi calculada segundo a equação:

$$\% \text{ variação de crescimento} = \frac{\text{comprimento médio da amostra} - \text{comprimento médio do controle} \times 100}{\text{comprimento médio do controle}}$$

4.3.12. Metodologia de identificação molecular de bactéria por meio do sequenciamento do rDNA 16S

Foi realizado o isolamento dos microrganismos presentes nos biorreatores e em seguida a identificação molecular dos mesmos.

A identificação molecular de bactérias é baseada na análise de seqüências de genes conservados, envolvendo a extração do DNA genômico e amplificação e seqüenciamento parcial do gene ribossomal 16S.

O DNA genômico de cada linhagem foi extraído segundo o método descrito por PITCHER *et al.* (1989) modificado. Os resultados da extração de DNA foram visualizados

em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo ($1\mu\text{L} \cdot 100\text{ mL}^{-1}$), e fotodocumentados utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, Bioluminescence System). As estimativas das concentrações de DNA foram feitas através da comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ).

Amplificação do rDNA 16S

A metodologia consiste na amplificação do DNA ribossomal 16S pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. O par de *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizado para a reação de PCR foram p27f (LANE, 1991) e p1401r (HEUER *et al.*, 1997), homólogos às extremidades conservadas do gene rRNA 16S de bactérias.

Detalhes da reação de PCR do rDNA 16S:

Reagentes	Concentração da Solução Estoque	Concentração final por reação
Solução tampão da <i>Taq</i>	10 X	1 X
<i>Primer</i> p27f	20 μM	0,4 μM
<i>Primer</i> p1401r	20 μM	0,4 μM
dNTP's	25 mM	200 μM
<i>Taq</i> -polimerase (Amersham Biosciences)	5 U/ μL	2 U
DNA	--	50-100 ng
H ₂ O	--	qsp. 50 μL

Programa de amplificação do rDNA 16S:

- 1 ciclo: 95°C por 2 min
- 30 ciclos: 94°C por 1 min
55°C por 1 min
72°C por 3 min
- 1 ciclo: 72°C por 3 min
- finalizar a 4°C

Primers:

27f - [5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3'], *forward*

p1401r - [5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA AGG-3'], *reverse*

Sequenciamento: Os fragmentos de rDNA 16S amplificados foram a seguir purificados utilizando o kit *GFXTM PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), e submetidos diretamente ao sequenciamento em seqüenciador automático MegaBace (Amersham Biosciences), empregando o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit fot MegaBace DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences, cod. US81090). Os *primers* internos ao gene para o rRNA 16S utilizados para o sequenciamento foram p10f (5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3'), p765r (5'- ATT AGA TAC CCT GGT AG - 3'), p782r (5'- ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT - 3') e p1100f (5'- GCA ACG AGC GCA ACC C -3'). Estes *primers* foram adicionados na concentração de 3,2 pmoles por reação.

Programa de PCR utilizado para o sequenciamento:

95°C/20 seg

50°C/15 seg 30 ciclos

60°C/1 min

hold 4°C

Análise filogenética: As sequências parciais de rDNA 16S obtidas com cada primer foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do software GDE (Genetic Data Environment, v.2.2, [gopher://megasun.dch.umontreal.ca:70/11/GDE](http://megasun.dch.umontreal.ca:70/11/GDE)) e comparadas com as sequências de rDNA 16S de organismos representados nas bases de dados RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA; <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foram então selecionadas diversas sequências de organismos relacionados à sequência do organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de KIMURA (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987).

4.3.13. Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em triplicatas e as análises estatísticas foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney pelo programa BioEstat 4.0.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Análises físico-químicas do efluente industrial

5.1.1- Análise comparativa do pH do efluente bruto e do efluente tratado

O efluente em estudo recebeu um tratamento preliminar para correção do pH (7,0-7,5) e temperatura (até 40 °C). Observa-se, na Figura 6, que o pH do efluente tratado, pelo sistema de biofiltros permaneceu com valores próximos a neutralidade, com diminuição do pH 6,6 apenas no tempo de retenção hidráulica (TRH/h) 10,28. Esses resultados são importantes, pois, de acordo com FERREIRA (2000), na implantação de projetos de tratamento de efluentes considera-se a manutenção do pH entre pH 6,5 a pH 8,0 para assegurar estabilidade da condição operacional.

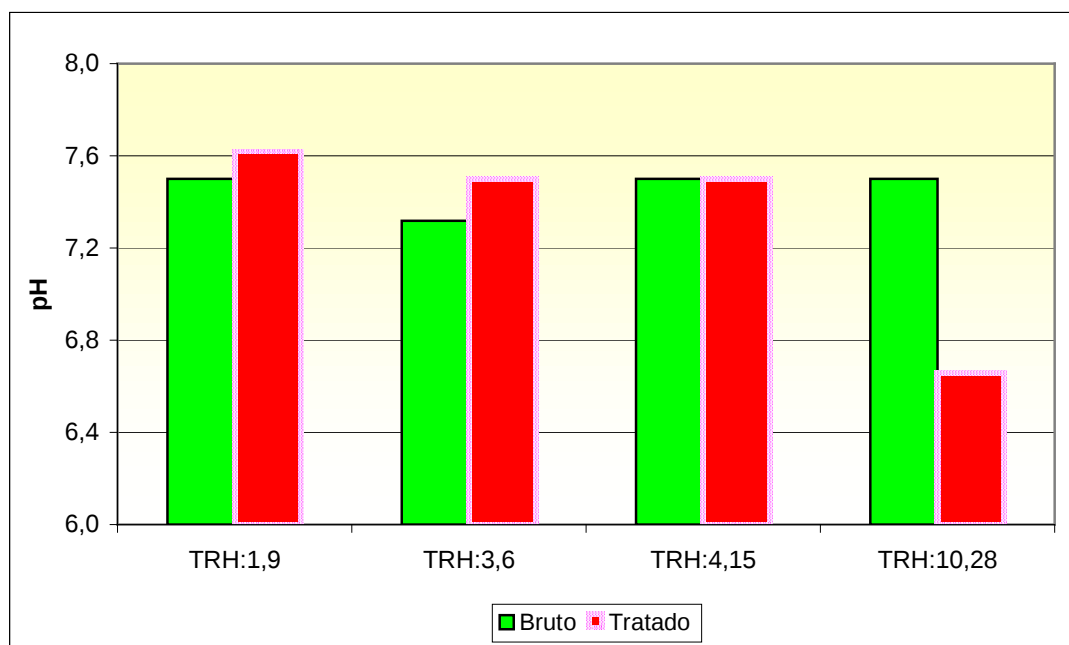


Figura 6: Análise Comparativa do pH do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes Tempos de retenção hidráulica em hora (TRH/h).

5.1.2- Contagem microbiana, controle da temperatura e do oxigênio dissolvido

A contagem microbiana do inóculo dos reatores apresentou pequenas oscilações, mas manteve-se praticamente, durante todo o processo, com cerca de 10^7 células (UFC/mL).

O controle da temperatura e do oxigênio dissolvido (OD) nos processos biológicos de tratamento são de grande importância. De acordo com VILLEN (2001), as velocidades de reação nos processos aeróbios são suficientemente elevadas, em temperaturas ambientes de 15 a 30 °C, sendo que as bactérias responsáveis pelo processo não são especialmente sensíveis a variações nessa faixa, não havendo, portanto, necessidade de aquecimento. O fornecimento de oxigênio suficiente para a respiração microbiana, (>2 mg/L) é a condição mais importante para o bom andamento de um processo biológico aeróbio. A temperatura e o oxigênio dissolvido dos reatores não sofreram grandes variações permanecendo entre 25-26 °C e 4-6 mg/L, respectivamente.

5.1.3 - Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Fósforo

No projeto de uma estação de tratamento, normalmente não há interesse em se determinar os diversos compostos dissolvidos na água residuária. Isto não só pela dificuldade em se executar vários destes testes em laboratório, mas também pelo fato dos resultados não serem diretamente utilizáveis como elementos de projeto e operação. Para quantificar as concentrações de matéria orgânica total e de matéria orgânica biodegradável determinam-se DQO e DBO₅, respectivamente.

Observa-se na Figura 7, que não houve diminuição da DBO apenas para o TRH 3,6. As diminuições que foram registradas para os TRHs 1,9; 4,15 e 10,28 foram de 67,4; 52,5 e 35,2%, respectivamente. As análises de DQO mostraram diminuição desse parâmetro para todos os TRHs analisados. As maiores razões de decaimento foram nos TRHs 3,6 (66,8%) e 4,15 (62,9%). As razões de DBO que atingiram os menores valores foram nos TRHs 1,9 (58,7%) e 10,28 (49,4%).

A figura 7 registra que o efluente em estudo apresenta quantidades significativas de fósforo. Porém o tratamento realizado efetivou sua remoção em 42,71%, no efluente tratado apenas no TRH 10,28. Nota-se pela análise estatística um valor de $p = 0,0495$, indicando que houve redução significativa para esse tempo. Provavelmente, nesse TRH maior houve menor arraste de células, bem como de seus metabólitos fosfatados.

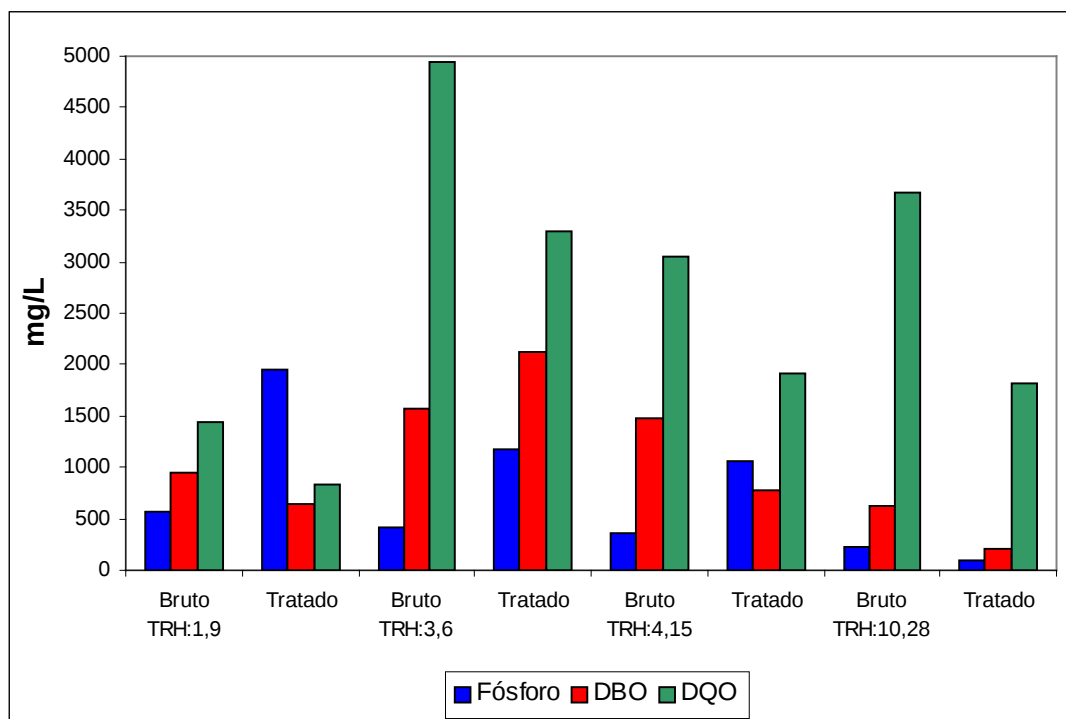


Figura 7: Análise Comparativa de Fósforo, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO mg/L 5 dias 20 °C) e Demanda Química de Oxigênio (mg/L) do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes Tempo de Retenção Hidráulica (TRH/h).

5.1.4 – Turbidez

São considerados tratados os efluentes industriais clarificados devido à remoção da matéria orgânica em suspensão (coloidal ou sedimentável) e dissolvida, bem como pela diminuição da presença de microrganismos. Segundo QUASIM (1985), a turbidez é causada por uma grande variedade de sólidos em suspensão, matéria orgânica em etapa de degradação microbiana e matéria inorgânica como argila e precipitados leves. Em corpos d'água a turbidez pode impedir a penetração da luz, prejudicando a fotossíntese. A fotossíntese é desejável, pois, além de introduzir oxigenação na água propicia a oxidação da matéria induzindo a clarificação. Desta maneira haverá prejuízos, por exemplo, em tratamentos realizados em lagoas facultativas, onde o oxigênio requerido pelas bactérias aeróbias é fornecido pelas algas e pelas bactérias fotossintetizantes.

Na Figura 8 estão registrados os resultados da turbidez do efluente bruto e do efluente tratado. Observa-se que, exceto para o TRH 3,6, houve diminuição em cerca de 50%, para os outros TRHs testados. O aumento da turbidez registrada no TRH de 3,6, provavelmente, deve-se ao crescimento bacteriano responsável pela biodegradação.

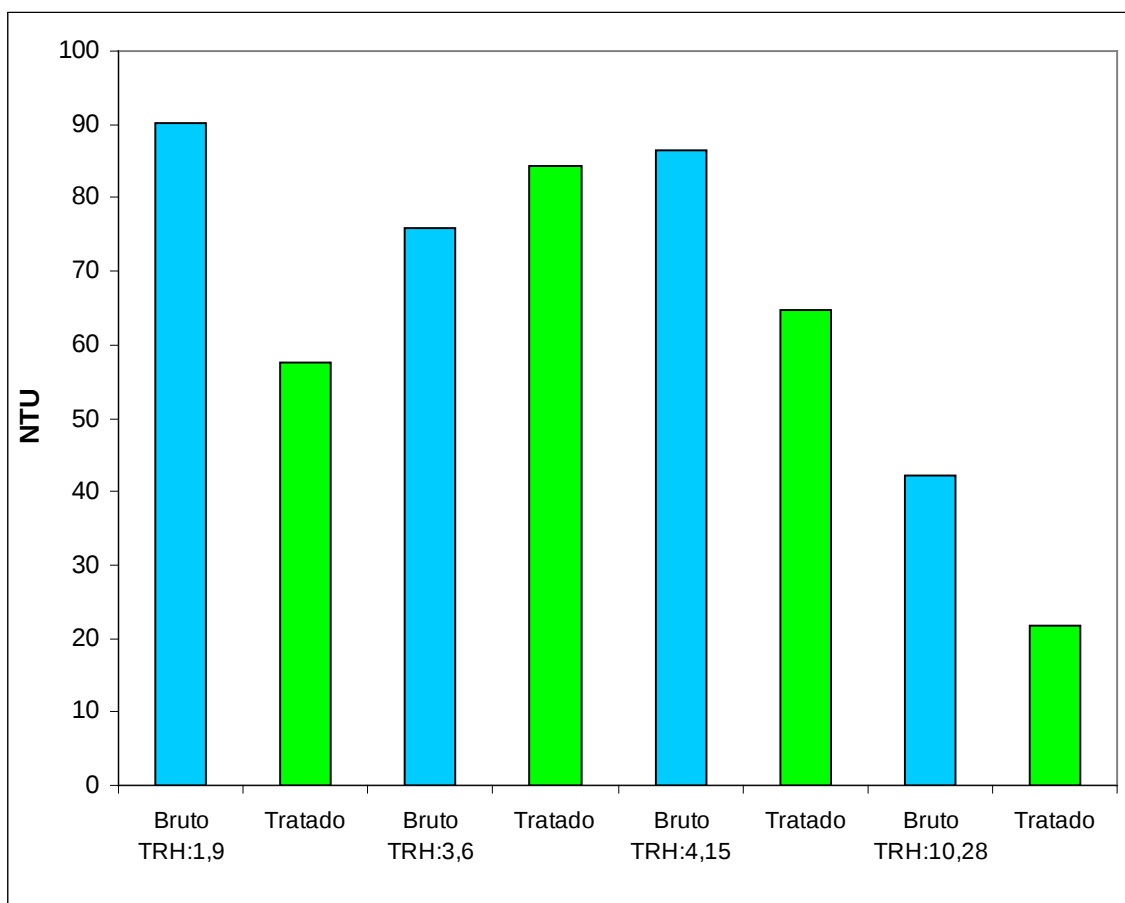


Figura 8: Análise Comparativa de Turbidez do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes TRH/h.

5.1.5 – Sólidos Sedimentáveis (SS)

De acordo com a legislação federal em vigor, a Resolução CONAMA nº 357 (2005) do Ministério do Meio Ambiente, a condição de lançamento para materiais sedimentáveis é de até 1 mL/L em teste de 1 h em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes.

Na figura 9 estão mostrados os resultados dos sólidos sedimentáveis (SS) presentes no efluente bruto e no efluente após tratamento. Apenas no TRH 10,28 h não foi

constatado nenhum valor. Provavelmente, esse fato ocorreu devido à vazão ser a menor utilizada no sistema de tratamento e, portanto, a sedimentação já ocorrera no próprio reator. O arraste de células provavelmente ocasionou o aumento dos SS nos outros TRHs testados.

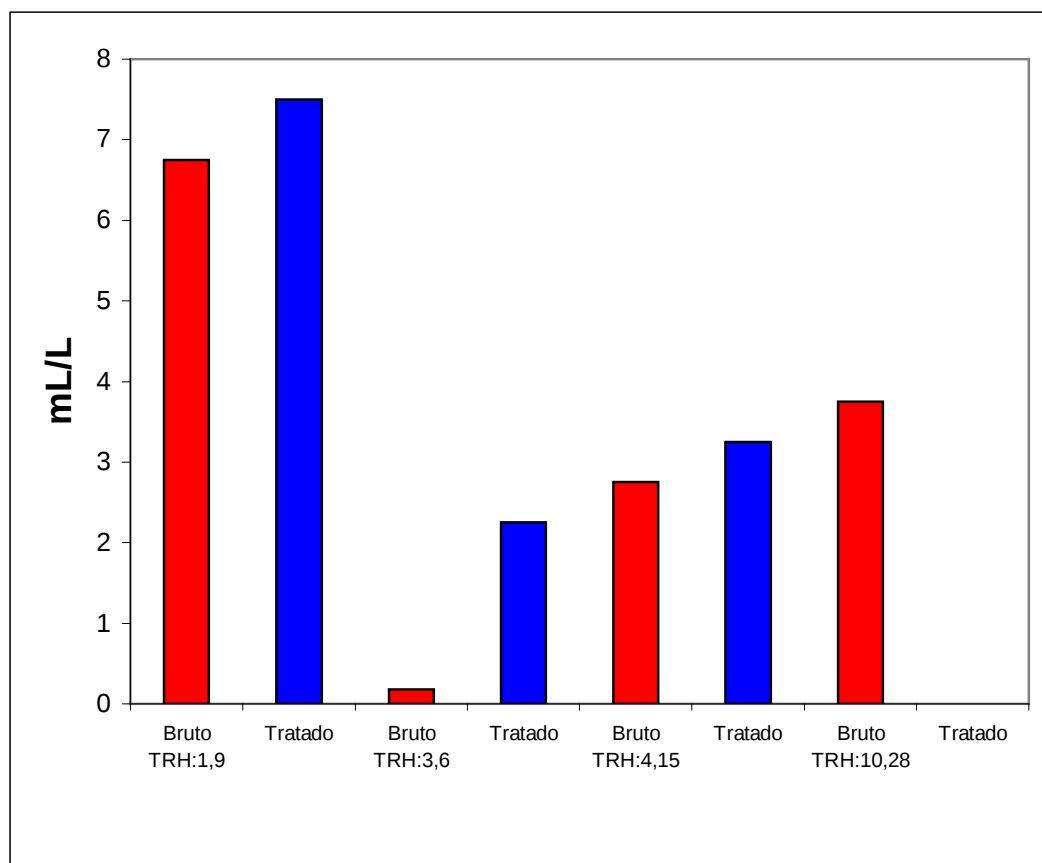


Figura 9: Análise Comparativa de Sólidos Sedimentáveis do Efluente Bruto e do Efluente Tratado em Diferentes TRH/h.

O TRH 3,6 favoreceu o arraste de células, bem como o de outros compostos pertencentes ao biofilme envolto na argila expandida. Isso pode ser observado através do aumento total de sólidos (turbidez e sedimentáveis), que influenciaram diretamente o aumento da DBO. É importante ressaltar que o efluente bruto utilizado no TRH 3,6

apresentou a maior concentração de DQO, fato esse que evidencia maior concentração de compostos não biodegradáveis.

5.1.6 - Condutividade

A condutividade fornece uma boa indicação das modificações na composição de uma água, especialmente na sua concentração mineral, mas não fornece nenhuma indicação das quantidades relativas dos vários componentes.

Nas análises de condutividade apresentadas na Figura 10, a maior razão de diminuição da condutividade no efluente tratado em relação ao bruto foi de 13,13 % para o TRH 1,9. Essa pequena redução ocorreu, provavelmente, em função da assimilação de nutrientes minerais pelo metabolismo microbiano.

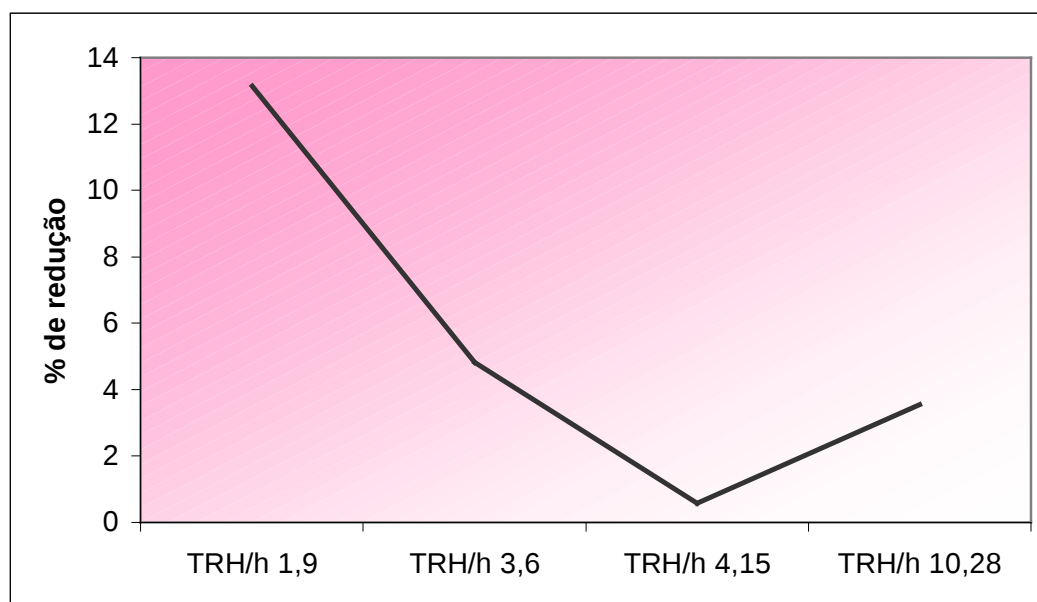


Figura 10: Porcentagem de diminuição da condutividade (uS/cm) do efluente após tratamento em diferentes TRHs.

Os resultados obtidos para os efluentes tratados devem-se, em grande parte, à presença de sais dissolvidos que dificilmente são removidos. Esse fato pode ser confirmado pelos valores obtidos na determinação da condutividade elétrica dos efluentes tratados que, em todos os casos, permaneceu próximo ao valor encontrado no efluente bruto (Tabela 2).

Estes dados vêm comprovar que a matéria inorgânica presente em água residuária é de remoção mais complexa e que exige outras tecnologias para sua eliminação.

Tabela 2: Condutividade (uS/cm) do efluente bruto e do efluente tratado.

<i>TRH/h</i>	<i>Efluente bruto</i>	<i>Efluente tratado</i>
1,9	2030	1763,33
3,6	1794	1707,33
4,15	1375,33	1367,33
10,28	1154	1113

5.1.7. Nitrogênio Amoniacal Total (NA)

Segundo BLAINE METTING (1992), amônia e pH são interdependentes, pois a amônia livre (NH_3) e o íon amônio (NH_4^+) têm seu equilíbrio afetado pelo pH. Em pH 7 e abaixo deste, o NH_4^+ está presente quase que exclusivamente nesta forma; enquanto que em pH 9 e acima deste, predomina a forma NH_3 .

O nitrogênio na forma de amônia livre (NH_3) é tóxico aos organismos aquáticos, cujas concentrações dependem principalmente da temperatura, pH e da

concentração de amônia total nos corpos d'água. As análises de nitrogênio amoniacal realizadas, tanto no efluente bruto quanto no tratado, não apresentaram valores significativos para esse parâmetro.

Na Tabela 3, estão mostrados os resultados da avaliação da concentração molar de nitrogênio amoniacal total, em diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH/h) do efluente bruto e tratado. Entretanto, a concentração de NA nos TRH/h de 4,15 e 10,28 permaneceu dentro das normas exigidas pela legislação CONAMA nº 357 (2005). Esses resultados demonstram que provavelmente o NA não teve efeito tóxico ou inibitório no sistema avaliado.

Segundo VILLA VERDE *et.al.* (1997), em seus estudos sobre a influência do pH na atividade nos biofilmes nitrificantes, observaram que aumentando o pH em uma unidade, ocorria aumento de 13% na eficiência do processo de nitrificação. A alta atividade de oxidação do íon amônio foi obtida em pH 8,2. O crescimento ótimo das bactérias nitrificantes deu-se no pH 8,0, coincidindo com a máxima atividade nitrificante. A concentração de biomassa aumentou quando houve diminuição da concentração de amônia.

Em diferentes TRH, o presente trabalho revelou estabilidade do pH, na maioria das vezes, acima de 7,0. Houve diminuição do pH, para 6,6 no TRH/h de 10,28. Em nenhum momento o pH aproximou-se de 8,0. Este fato pode ter contribuído significativamente para a não ocorrência da oxidação do nitrogênio amoniacal pelas bactérias nitrificantes.

Tabela 3 - Concentração molar de nitrogênio amoniacal total, em diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH/h) de efluente bruto e tratado.

<i>TRH/h</i>	<i>Bruto</i>	<i>Tratado</i>
1,9	$2,54 \times 10^{-6}$	$5,79 \times 10^{-4}$
3,6	$3,99 \times 10^{-5}$	$3,68 \times 10^{-3}$
4,15	$5,05 \times 10^{-6}$	$7,25 \times 10^{-6}$
10,28	$1,90 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-5}$

5.2 - Ensaios Biológicos de Toxicidade

5.2.1 – Toxicidade frente a *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade avaliam o efeito do efluente como um todo ou mediante a avaliação das substâncias específicas que o compõem.

As Tabelas 4 e 5 sintetizam os dados obtidos em todas os TRH testados no efluente bruto e tratado. Observou-se que, na medida em que o TRH aumentou houve diminuição da remoção da toxicidade sobre o microcrustáceo, indicando provavelmente que a diminuição da vazão não interferiu positivamente no teste de toxicidade em questão. Os valores de toxicidade aguda detectados nos efluentes bruto e tratado são apresentados na Tabela 3. Os valores de CE50, convertidos em Unidades Tóxicas, demonstraram a redução da toxicidade em todos os TRH testados.

Tabela 4: Resultados obtidos com o ensaio de toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia similis*, utilizando o efluente bruto e o tratado pelo sistema de biofiltros, em diferentes tempos de retenção hidráulica.

TRH: 1,9	
Efluente bruto	CE(50) = 13,19 U. T. = 7,58
Efluente tratado	CE(50) = 27,66 U. T. = 3,61
TRH: 3,6	
Efluente bruto	CE(50) = 42,39 U. T. = 2,36
Efluente tratado	CE(50) = 55,32 U. T. = 1,81
TRH: 4,15	
Efluente bruto	CE(50) = 64,61 U. T. = 1,55
Efluente tratado	CE(50) = 72,68 U. T. = 1,37
TRH: 10,28	
Efluente bruto	CE(50) = 52,80 U. T. = 1,89
Efluente tratado	CE(50) = 57,85 U. T. = 1,73

O nitrogênio amoniacal aumentou no efluente em todos os TRHs após tratamento. Apesar deste aumento, houve redução significativa da toxicidade no efluente tratado em todos os TRHs testados. A tabela 4 apresenta a porcentagem de diminuição da toxicidade, do efluente tratado em relação ao bruto. A maior porcentagem dessa diminuição ocorreu para o TRH 1,9.

Tabela 5: Avaliação da toxicidade aguda empregando-se o ensaio biológico com *Daphnia similis*, no efluente em diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH/h).

TRH/h	diminuição da toxicidade (%)
1,9	52,3
3,6	23,3
4,15	11,6
10,28	8,4

5.2.2 – Toxicidade frente a germinação de *Lactuca sativa* (alface)

O resultado do teste de germinação e inibição do crescimento da raiz de sementes de alface, apresentado na Tabela 6, demonstra que não houve inibição da germinação das sementes, em ambos os efluentes. Entretanto, o crescimento da raiz foi menor, praticamente para todas as diluições e TRH do efluente tratado, porém quando analisadas estatisticamente não demonstraram significância. O decaimento de parte da matéria orgânica pelo tratamento pode ter propiciado esta pequena diferença, Provavelmente, alguns fatores de crescimento estavam presentes no efluente bruto e foram removidos no tratamento.

Tabela 6: Porcentagem de variação do crescimento radicular de sementes de *Lactuca sativa* no efluente pré e pós tratamento biológico.

	<i>TRH/H: 1,9</i>		<i>TRH/h: 3,6</i>		<i>TRH/h: 4,15</i>		<i>TRH/h: 10,28</i>	
[]efluente (%)	Bruto	Tratado	Bruto	Tratado	Bruto	Tratado	Bruto	Tratado
1,56	1.15	1.06	1.07	0.82	0.65	0.94	1.20	1.00
3,13	1.12	1.00	1.08	0.95	0.84	1.03	1.24	0.86
6,25	1.13	0.91	1.04	0.57	0.74	0.94	1.05	0.95
12,50	1.20	1.09	1.12	0.96	0.90	1.63	1.15	1.15
25	1.66	1.11	0.90	0.39	1.05	1.17	1.57	0.51
50	1.59	1.02	0.62	0.15	0.84	1.35	1.41	0.42

5.3- Identificação microbiana

Durante a coleta diária de amostras de cada biofiltro para as análises de microscopia óptica (Figura 11), observou-se a presença predominante de protozoários ciliados livre-natantes (*Paramecium*). Verificou-se também a presença de protozoário flagelado e raramente a presença de protozoário ciliado fixo. Ao longo do período de monitoramento dos reatores observou-se a presença de cistos, em pequeno número, em todas as unidades.

Os ciliados livres indicam estabilização da matéria orgânica e se alimentam de outros protozoários. Segundo QUAGLIA e BONFIM (1996) os protozoários flagelados são bastante comuns e dominam a maioria dos ambientes aquáticos onde existe grande disponibilidade de matéria orgânica. A presença desses microrganismos indica condições aeróbias e baixa toxicidade. Os ciliados pedunculados (fixos) são caracterizados por habitar águas com baixa disponibilidade de alimento e níveis de oxigênio satisfatório.

Observou-se a cessação e a redução do movimento dos cílios em alguns protozoários ciliados livre-natantes (*Paramecium*). Segundo COSTA *et. al.* (2003) provavelmente nesse período os reatores foram alimentados com efluente bruto com nível de toxicidade mais elevado.

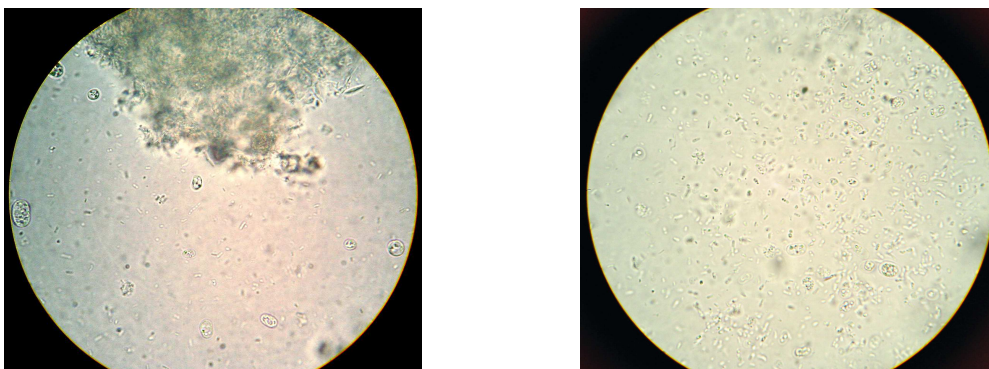


Figura 11: Fotos das análises microscópicas de amostras coletadas nos biorreatores.

A identificação das linhagens foi feita pela análise de sequência do gene RNA ribossomal 16S usando a rotina BLAST do Genbank e do RDP (Ribosomal Data Project II 9.0). A distância evolutiva foi baseada no modelo Kimura 2p e a árvore filogenética (Figura 12) foi reconstruída pelo método *Neighbour Joining*, utilizando o programa Mega 2.0.

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S mostrou que a maioria das linhagens estudadas (linhagem 1A, 1C, 3B, 3D e 4A) pertence à Família *Enterobacteriaceae*. As linhagens 1A, 1C e 3B encontram-se relacionados mais especificamente com o gênero *Klebsiella*, mostrando de 99% a 100% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S com diversas sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Klebsiella* sp., além de espécies tipo deste gênero. A análise filogenética (Figura 12) mostra o agrupamento das linhagens 1A, 1C e 3B com linhagens do gênero *Klebsiella* incluindo algumas espécies tipo. A identificação destas linhagens em nível de espécie não foi possível uma vez que a análise de sequências do RNA ribossomal 16S não apresenta boa resolução para o grupo das enterobactérias, sendo necessário a utilização de outras técnicas moleculares ou fenotípicas para a identificação da espécie.

Ainda, pertencendo à Família *Enterobacteriaceae*, a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das linhagens 3D e 4A apresentaram entre 98% e 99% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens do gênero *Enterobacter*, quando analisadas nos bancos de dados Genbank e RDP. A Figura 12 mostra a análise filogenética das linhagens 3D e 4A indicando o forte agrupamento com o gênero *Enterobacter*.

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da linhagem 4B apresentou 99% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de

linhagens do gênero *Aeromonas*. A Figura 12 mostra a análise filogenética da linhagem 4B indicando que esta linhagem pertence à espécie *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*.

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da linhagem 4F apresentou entre 98% e 99% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens do gênero *Wautersiella* e similaridades mais baixas 95% com o gênero *Flavobacterium*. A Figura 12 mostra a análise filogenética da linhagem 4F indicando o forte agrupamento com o gênero *Wautersiella*.

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S mostrou que 2 linhagens estão relacionadas com o gênero *Bacillus*. A linhagem 3E apresentou entre 97% e 99% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Bacillus* sp. disponíveis nas bases de dados Genbank e RDP, enquanto que a linhagem 4D apresentou 99% de similaridade com diversas espécies de *Bacillus*, entre elas, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides*.

A análise filogenética (Figura 12) mostra o agrupamento das linhagens 3E e 4D com linhagens do gênero *Bacillus* incluindo algumas espécies tipo. Entretanto, os resultados da análise filogenética não foram conclusivos, não permitindo definir a espécie a que pertence cada um dos isolados. Neste caso, outras características como forma de esporos devem ser avaliadas para a conclusão em nível de espécie neste grupo.

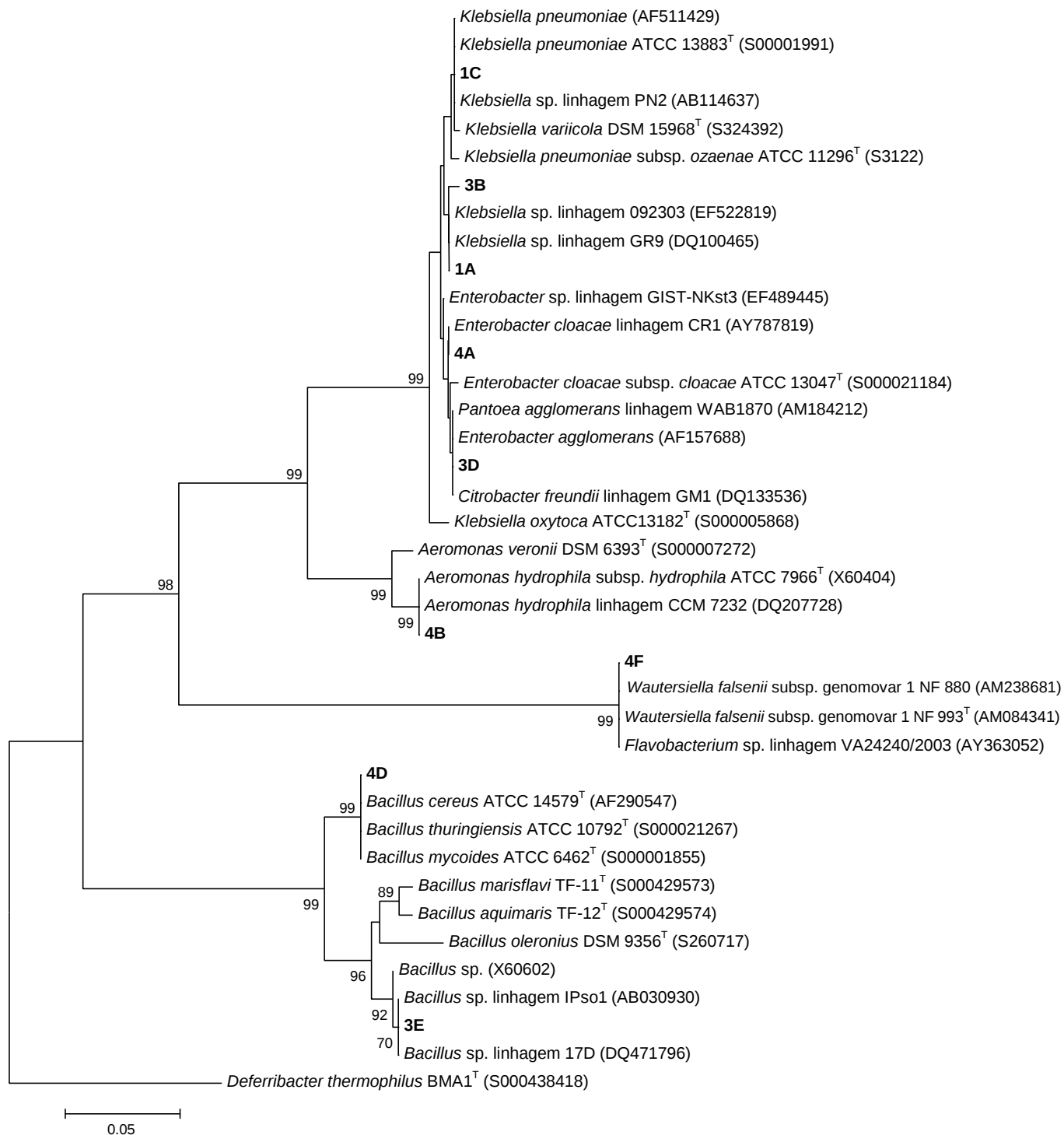


Figura 12: Análise filogenética de seqüências parciais do gene RNA ribossomal 16S. A distância evolutiva foi baseada no modelo Kimura 2p e a árvore filogenética foi reconstruída pelo método *Neighbour Joining*, utilizando o programa Mega 2.0. Valores de *Bootstrap* maiores que 70% estão indicados na árvore. O número de acesso GenBank ou RDP está entre parênteses. *Deferribacter thermophilus* BMA1^T foi usada como *outgroup*.

6- CONCLUSÕES

- O sistema de reatores utilizado neste trabalho foi capaz de manter o pH próximo à neutralidade, a temperatura constante e a concentração de O₂ dissolvido, condições desejáveis e importantes no processo de tratamento do tipo de efluentes estudado. O sistema de tratamento, empregando 4 reatores acoplados, foi eficiente para a remoção da matéria orgânica poluente do efluente da indústria.

- O TRH 1,9 mostrou ser o mais eficiente, visto que é o tempo com a maior vazão, fato de extrema importância para o tratamento de efluentes industriais. Neste TRH houve maior porcentagem de remoção da DBO, condutividade, além de significativa remoção da DQO. Alterações no TRH refletem na diminuição da toxicidade do efluente tratado, quando se utiliza o microcrustáceo *Daphnia similis* no bioensaio e as diminuições mais acentuadas foram obtidas em TRHs menores. Entretanto, não foram verificadas alterações significativas na toxicidade no bioensaio com a semente de alface (*Lactuca sativa*).

- O sistema de 4 reatores aeróbios acoplados diminuiu a DQO em todos os tempos de retenção hidráulica avaliados.

- A análise estatística realizada mostrou redução significativa, ou seja com valores de $p = 0,0495$, para a maioria dos parâmetros avaliados.

- No sistema de 4 reatores aeróbios acoplados o efluente da indústria enquadrou-se nas normas exigidas pelos órgãos de Controle Ambiental do País ou Estado.

- O TRHs extremos 1,9 e 10,28 foram mais eficientes para a diminuição da turbidez do efluente.

- A manutenção do pH próximo à neutralidade pode ter contribuído para a não oxidação do oxigênio amoniacal pelas bactérias nitrificantes no sistema de reatores utilizado neste trabalho.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLAINE M. F. Jr. Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. Washington: **Environmental Sciences Departament Battelle Pacific Northwest Laboratories Richland**, p. 527, 1992.

BLAISE, C.; COSTAN, G. The acute lethal toxicity of effluents in Quebec to rainbow trout. **Water Pollutants Research Journal Canadian**, v.22, n.3, p.385-402, 1987.

CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. *Daphnia similis*: avaliação da sensibilidade e reprodução em diferentes condições de cultivo. São Paulo, p.107, 1992.

CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo, p.7, 1990 b.

CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos, p. 17, São Paulo, 1990 a.

CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. Série Manuais: Operação e manutenção de lagoas anaeróbias e facultativas. p. 91, São Paulo, 1989.

CHIBATA, I. Immobilized microbial cells with polycrylamide gel and carrageenan and their industrial application. In: Venkatsubramanian, K. **Immobilized Microbial Cells, ACS Symposium series 106**, p. 187-202, 1979.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Methods of cell immobilization. In: Demain, A.L.; Salomon, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**, p. 217-229, 1986.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n 357, Classificação das águas e padrões de emissão, 17 de março de 2005. Disponível em <www.mma.gov.br>. Acesso em: 22/06/2007.

CONEGLIAN, Cassiana Maria Reganhan. **Diminuição da concentração de amônia de efluente industrial Petrobras/Replan.** (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas) Área de Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

COSTA, F. C.; CAMPOS, J. C.; SANT' ANNA JR. G. L.; DEZOTTI, M. Aplicação de carvão ativado em pó (CAP) ao processo biológico de tratamento de um efluente da indústria química. **Engenharia sanitária e ambiental**, p. 170-176, vol. 9, nº 2 abr/jun, 2003.

DINÇER, A. R.; KARGI, F. Kinetics of sequential nitrification and denitrification process. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 37-42, nº 27, 2000.

DUTKA, B.J.; (Ed.) Methods for microbiological na toxicological analysis of water, wastewater and sediments. **National Water Research Institute**, Burlington, Ontario-Canadá, p. 127, 1989.

ECKENFELDER, W.W. Strategiesfor toxicity reduction in industrial wastewaters. **Water Science and Technology**, p.185-193, v.24, nº 7, 1991.

FEEMA – FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE. Coletânea de legislação federal e estadual de meio ambiente. p. 384, Rio de Janeiro, 1992.

FERREIRA, E.S. Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e denitrificação biológica. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2000.

GIORDANO, G. Tratamento e controle de efluentes industriais – Disponível em www.ufmt.br/esa/modulo_II_Efluentes_Industriais/Apost_EI_2004_1ABES_Mato_Grosso_UFMT2.pdf . Acesso em 13/04/2006.

GONÇALVES, R. F., Aspectos teóricos e práticos do tratamento de esgoto sanitário em biofiltros aerados com leito granular submerso. **In: Seminário Internacional**, Belo Horizonte, MG, 6 - 8/03, 1996.

GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S.; EATON, A.D. **Standard methods for the examination of water and wastewater** 18 ed. WASHINGTON: American Public Health Association, 1992.

GRADY Jr, C.P.L. e LIN, H.C., Biological wastewater treatment, **Pollution engineering and technology**, New York: Marcel Decker, inc, p.963, 1980.

GUIMARÃES, J.R; NOUR E. A. A., Tratando Nossos Esgotos: Processos que imitam a natureza, **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, Edição Especial 05/2001, Disponível em <www.peq.coppe.ufrj.br/areas/labpol>. Acesso em 22/03/2005.

HEUER, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E.M., Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, 63, p. 3233-3241, 1997.

HIRAKAWA, C.; PIVELI R.P.; SOBRINHO P.A.; Biofiltro aerado submerso aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator UASB – Estudo em escala piloto com esgoto sanitário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, nº 1 – jan/mar e nº 2 – abr/jun, 2002.

HOILJOKI, T. H.; KETTUNEN, R. H.; RINTALA, J. A. Nitrification of anaerobically pretead municipal landfill leachate at low temperature. **Wat. Res.**, v. 34, nº 5, p. 1435-1446, 2000.

JIRKA, A.M. & CARTER, M.J. Micro semi – automated analysis of surface and wastewaters for chemical oxygen demand. **Analytical Chemistry**, v. 47, nº 8, p. 1397-1402, 1975.

KIMURA, M., A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** n° 16, p.111-120, 1980.

LANDIS, W.G.; YU, M., Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems. **Boca Raton**: CRC Press, p. 328, 1995.

LANE, D.J., In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, John Wiley & Sons, Chichester-England, 1991.

MARGARITIS, A.; MERCHANT, F.J.A., Advances in ethanol production using immobilized cell systems. **Crit. Rev. of Biotechnol.**, v. 1, n° 4, p. 339-395, 1984.

NEOTEXASTM – OP3, **Manual de microbiologia de lodos ativados**, 1997.

ORTOLANO, M.R. Utilização de ensaios com a bactéria *Spirillum volutans* no monitoramento da toxicidade de efluentes de indústria de celulose e papel. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.

PITCHER, D. G.; Saunders, N. A. & Owen, R. J., Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Lett. Appl. Microbiol.** 8: 151-156, 1989.

QUAGLIA, L. J. & BONFIM, P. M. Estudo da microfauna na lagoa aerada da Bahia Sul Celulose S.A. Anais do 29º Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP. p. 529-537, 1996.

QUASIM, S.R. Wastewater treatment plants: planning, design and operation. **Holt, Rinehart and Winston**, New York, 1985.

RAMALHO, R. S. Tratamiento de aguas residuales. **Barcelona: Editorial Reverté S. A.**, p.705, 1991.

REINOLD, R.M., **Manual Prático de Cervejaria**, Aden Editora, São Paulo, 1997.

REIS, J. A. T.; MENDONÇA, A.S.F., Teores limites para compostos amoniacaís em efluentes e corpos receptores – Conflitos e interrelações. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 1995.

SAITOU, N. & Nei, M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** nº 4, p.406-425, 1987.

SANTIAGO, V.M.J., Tecnologias para remoção de amônia. **CENPES/SITER/SEBIO**. p. 46, 1994.

SANTOS, I., MELO, F. Aplicação de argila expandida em zonas húmidas artificiais ou leitos construídos de macrófitas, **Encontro nacional sobre qualidade e inovação (QIC)**, Lisboa 23/11/2006. Disponível em: <http://qic2006.Inec.pt/documentos/qic2006_programa.pdf>. Acesso em 16/05/2007.

SAPIA, P.M.A.; MORITA D.M. Critérios de recebimento de efluentes não domésticos em sistemas públicos de esgotos: uma análise crítica, 2002. Disponível em: <www.abes-dn.org.br>. Acesso em 11/11/2006.

SAWYER, C. N.; Mc CARTY, P. L. **Chemistry for environmental engineering**. 3^a ed. New York, Mc Graw Hill, inc. p. 532, 1978.

SINDICERV – Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja, 2001.

STOLP. H. Microbial Ecology: organisms, habitats, activities. **Cambridge University Press**, p. 308, 1988.

VILLA-VERDE, S.; GARCIA-ENCINA, P.A.; FDZ-POLANCO, F. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. Start-up influence. **Wat. Res.**, v. 31, nº 5, p. 1180-1186, 1997.

VILLEN R. A., **Biotechnologia Industrial**, Processos Fermentativos e Enzimáticos - Tratamento Biológico de Efluentes, Cap. 23, Vol. III, 2001.

- VON SPERLING, M., **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**, Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; 3 ed., Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; v. 1. 452p., 2005.
- VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: [s.n.], (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v.2), 211p., 1996.
- VRIENS, L.; VAN SOEST, V.; VERACHTERT, H. Biological treatment of malting and brewing effluents. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.10, nº 1, p. 1-46, 1990.
- WATSON, J.D.; BERRY, A., **DNA: o segredo da vida** – tradução Carlos Afonso Malferrari. – São Paulo: Companhia das Letras, 2005.
- WILKINSON, L. **Systat: the system for statistics**. Evanston: 822p., 1988.
- WINKLER, M. Biological treatment of wastewater. **Ellis Horwood Publishers, Chichester**, 301 p., 1981.
- YIANNAKOPOULOU, V. Protozoa in treatment systems., **Pulp & Paper Report**, 1998.