



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DIANE RODRIGUES SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CLORO LIVRE EM
BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES E NITRIFICANTES**

**FLORIANÓPOLIS
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Diane Rodrigues Silveira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CLORO LIVRE EM
BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES E NITRIFICANTES**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina, para a obtenção do grau
de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Hugo
Moreira Soares

Coorientador: Dr. Cléo Rodrigo
Bressan

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silveira, Diane Rodrigues

Avaliação da Toxicidade de Cloro Livre em Bactérias Desnitrificantes e Nitrificantes / Diane Rodrigues Silveira; orientador, Hugo Moreira Soares; coorientador, Cléo Rodrigues Bressan – Florianópolis – SC; 2014.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
101 pg.

Inclui referências

1. Engenharia Química, 2. Toxicidade. 3. Cloro livre. 4. Desnitrificação. 5. Nitrificação. I. Soares, Hugo Moreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

**Avaliação da Toxicidade do Cloro Livre em Bactérias
Desnitrificantes e Nitrificantes**

por

Diane Rodrigues Silveira

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
orientador

Dr. Cléo Rodrigo Bressan
coorientador

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Prof^{ta}. Dr^a. Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Florianópolis, 31 de março de 2014.

Dedico este trabalho a minha mãe, Dinamar,
por confiar e acreditar em meus projetos de
vida. “Tudo aquilo que sou ou pretendo ser,
devo a um anjo: minha mãe.”
(Abraham Lincoln)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir terminar esta jornada.

Aos meus pais, Dinamar e Pedro Vaner, a minha avó, Doraci, aos meus irmãos Vania, Deise, Vitor e Gabriel pelo amor, apoio, paciência e por estarem sempre ao meu lado.

Ao professor Hugo Soares e ao Cléo, pelo apoio e orientação neste trabalho.

Aos professores Willibaldo e Luismar pelos esclarecimentos das dúvidas no decorrer deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química (UFSC) pela oportunidade de Estudo.

Aos bolsistas que trabalharam comigo, Camila e Amanda, pelo apoio nos experimentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), Camila Michels, Gabriela, Janaina, Marcos, Daiane, Michele pelas horas de descontração, amizades e momentos difíceis.

Aos colegas de outros laboratórios do EQA, Jarina, Maria Clara, Simone, Mylena pela troca de conhecimentos e amizade.

Aos colegas e amigos que fiz neste tempo de mestrado.

Ao órgão de fomento de pesquisa, CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os processos biológicos mais conhecidos para o tratamento de águas residuárias com alta carga de nitrogênio são a nitrificação e a desnitrificação. Por serem tecnologias que envolvem a atuação de bactérias, vários fatores podem interferir no processo, promovendo a diminuição da atividade biológica e resultando na diminuição da eficiência no tratamento das águas residuais. O cloro é comumente utilizado para limpeza de equipamentos e instalações, podendo entrar na corrente do efluente e promover toxicidade ou inibição nas bactérias utilizadas no tratamento biológico. O cloro livre em contato com microorganismos difunde-se facilmente pela parede celular das bactérias inativando enzimas e comprometendo, de forma parcial ou total, o metabolismo celular. Desta forma, o presente trabalho busca avaliar o efeito do cloro livre sobre a cinética de consumo dos substratos das bactérias desnitrificantes e nitrificantes, para obtenção de dados referentes à toxicidade aguda do cloro sobre estes grupos microbianos. Com este propósito, inóculos de bactérias desnitrificantes e nitrificantes foram aclimatados e enriquecidos para utilização nos experimentos em batelada de toxicidade aguda. Foi utilizado nos testes de toxicidade hipoclorito de sódio nas concentrações de cloro livre de 0,00 a 100,00 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Inicialmente a biomassa foi exposta ao cloro por 20 minutos e, posteriormente, centrifugada para a retirada do cloro, dando então início aos ensaios para avaliação das cinéticas de consumo dos substratos. Com este procedimento foi possível identificar as IC50 de 42,9 e 40,3 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, em concentrações celulares iniciais de 1,77 g $\text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ e 1,53 g $\text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ e pH de 7,3 e 7,4, para a desnitrificação e nitrificação, respectivamente. Foi realizado também um experimento utilizando a IC50 obtida na desnitrificação variando a concentração de biomassa. Pôde-se observar que o cloro livre na concentração da IC50 obtida teve um efeito inibitório completo até a concentração de 1,0 g $\text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ e acima desta concentração a desnitrificação foi estabelecida através da biomassa que ainda permanecia ativa. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho apontam para um mecanismo de ação do cloro que resulta na inativação de uma quantidade fixa de biomassa para uma dada concentração de cloro livre, e não um percentual da mesma como é pressuposto no conceito de IC50.

Palavras-chave: Toxicidade. Cloro livre. Desnitrificação. Nitrificação.

ABSTRACT

The best known biological processes for the treatment of wastewater with high nitrogen load are nitrification and denitrification. Since those technologies involve the action of bacteria, many factors can interfere in the process, leading to a reduction of biological activity, resulting in decreased efficiency of the wastewater treatment. Chlorine is commonly used for cleaning of equipment and facilities, and may get in the wastewater stream and promote toxicity or inhibition in the bacteria used in biological treatments. Free chlorine in contact with microorganisms diffuses easily through cell walls, particularly of bacteria, and inactivates enzymes thus compromising partially or totally the cellular metabolism. This study aims to assess the effect of free chlorine on the kinetics of substrate consumption of nitrifying and denitrifying bacteria to obtain data on the acute toxicity of chlorine on these microbial groups. For this purpose, an inoculum of denitrifying and nitrifying bacteria were acclimated and enriched for use in batch experiments of acute toxicity. Sodium hypochlorite was used to evaluate toxicity of free chlorine concentrations from 0.00 to 100.00 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Initially, biomass was exposed to chlorine for 20 minutes and then centrifuged to remove the chlorine, so the assays for evaluation of the kinetics of substrate consumption could be performed. With this procedure it was possible to identify IC_{50} of 42.9 and 40.3 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ for initial cell concentrations of 1.77 g $\text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ and 1.53 g $\text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$, and pH 7.3 and 7.4, for the nitrification and denitrification, respectively. An experiment was also performed using the IC_{50} obtained in the denitrification by varying the biomass concentration. It was observed that the concentration of free chlorine in the obtained IC_{50} had a complete inhibitory effect up to a concentration of 1.0 g $\text{SSV} \cdot \text{L}^{-1}$; above this concentration the denitrification was evaluated by the biomass which was still active. Thus, the data obtained in this study point to a mechanism of action of chlorine that results in the inactivation of a fixed amount of biomass for a given concentration of free chlorine, and not of a percentage of it as usually assumed for the determination of IC_{50} .

Keywords: Toxicity. Free chlorine. Denitrification. Nitrification.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gêneros de bactérias que contêm espécies desnitrificantes	43
Tabela 2 - Composição do meio sintético para bactérias desnitrificantes ..	45
Tabela 3 - Composição do meio sintético para bactérias nitrificantes	46
Tabela 4 - Solução de micronutrientes (VISHNIAC; SANTER, 1957)	46
Tabela 5 – Operação de aclimação dos inóculos	48
Tabela 6 - Concentrações dos sais para lavagem da biomassa desnitrificante, dissolvidos em tampão fosfato de potássio e hidróxido de sódio em pH 7,4.	51
Tabela 7 - Concentrações dos sais para lavagem da biomassa nitrificante, dissolvidos em tampão fosfato de potássio e hidróxido de sódio em pH 7,4.	51
Tabela 8 - Concentrações de hipoclorito de sódio adicionadas no teste de toxicidade.....	52
Tabela 9 - Velocidades de redução de nitrato e respectivas velocidades específicas nas diferentes concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias desnitrificantes.	69
Tabela 10 - Velocidades de formação de $N-NO_x^-$ e respectivas velocidades específicas nas diferentes concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias nitrificantes.	74
Tabela 11 - Velocidades de consumo de nitrato e respectivas velocidades específicas de consumo de nitrato nas diferentes concentrações de SSV, após o contato com cloro livre a $42,60 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de HOCl e OCl ⁻ em solução aquosa em função do pH. Gráfico produzido a partir do software CURTIPOT (GUTZ, 2012). ...	31
Figura 2 - Curva de cloro residual mostrando um "Break Point" típico. Conteúdo de nitrogênio amoniacal na água, 1,0 mg.L ⁻¹ . AZEVEDO NETTO (1976).....	33
Figura 3 – Formas encontradas de cloro em contato com águas. (AZEVEDO NETTO, 1976)	35
Figura 4 - Locais alvos dos biocidas na célula microbiana. Adaptado de RUSSEL, apud BITTON (2005).....	36
Figura 5 - Porcentagem de amônia livre (NH ₃ -N) (em relação ao total de N presente) e porcentagem de ácido nitroso (HNO ₂ -N) (em relação à quantidade de nitrito presente) a 30°C. (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007)	41
Figura 6 - Sistema utilizado para enriquecimento da biomassa. Reator nitrificante à esquerda e desnitrificante à direita.....	47
Figura 7 – Diagrama de representação da metodologia aplicada aos ensaios de toxicidade.	50
Figura 8 - Sistema utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade aguda sobre bactérias desnitrificantes.	53
Figura 9 - Sistema utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade sobre bactérias nitrificantes.....	55
Figura 10 – Monitoramento das formas nitrogenadas e DQO na saída do reator de cultivo de biomassa desnitrificante para utilização nos testes de toxicidade. Carga de alimentação em 3 etapas: 20,00, 42,92 e 85,84 mg N.L ⁻¹ .dia ⁻¹	63
Figura 11 - Eficiência de conversão da desnitrificação ao longo do cultivo da biomassa para utilização nos experimentos de toxicidade.	64
Figura 12 - Monitoramento das formas nitrogenadas do reator de cultivo de biomassa nitrificante para utilização nos testes de toxicidade. Carga de alimentação em 3 etapas: 20,00, 42,92 e 85,84 mg N.L ⁻¹ .dia ⁻¹	65
Figura 13 - Eficiência de conversão da nitrificação ao longo do cultivo da biomassa para utilização nos experimentos de toxicidade.	66
Figura 14 - Experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias desnitrificantes. Consumo de nitrato em função da concentração de cloro	

livre ($\text{mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) adicionada anteriormente à cinética sobre as bactérias desnitrificantes.	67
Figura 15 – Cinética de desnitrificação em função da concentração de cloro livre ($\text{mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) em experimento de toxicidade aguda. (A) Formação de nitrito. (B) Consumo de acetato.	68
Figura 16 - Velocidades específicas de redução do nitrato em função das concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias desnitrificantes	70
Figura 17 - Correlação entre o grau de inibição na desnitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre.	71
Figura 18 – Relação molar de cloro livre adicionado em bactérias desnitrificantes e sólidos suspensos voláteis inicial, na etapa de contato....	72
Figura 19 - Experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias nitrificantes. Formação de NO_x^- em função da concentração de cloro livre ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) adicionada anteriormente sobre as bactérias nitrificantes.....	73
Figura 20 - Velocidades específicas de formação de N-NO_x^- versus concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias nitrificantes. ..	75
Figura 21 – Correlação entre o grau de inibição na nitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre.	75
Figura 22 - Relação molar de cloro livre adicionado em bactérias nitrificantes e sólidos suspensos voláteis inicial, na etapa de contato.	76
Figura 23 - Experimento de toxicidade aguda realizado com variação da concentração de bactérias desnitrificantes. Consumo de nitrato ao longo do tempo em função da concentração de SSV ($\text{g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) após a etapa de contato com a biomassa e o cloro a $42,6 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	77
Figura 24 - Cinética de desnitrificação em função da concentração de SSV ($\text{mg SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) em experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias desnitrificantes, após a etapa de contato com a biomassa e o cloro a $42,6 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. (A) Formação de nitrito. (B) Consumo de acetato.	79
Figura 25 - Velocidades específicas de redução do nitrato versus concentração de biomassa desnitrificante, após o contato com cloro livre à concentração final nos frascos de $42,60 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ em ensaio de toxicidade aguda.	81
Figura 26 - Velocidades específicas de redução do nitrato em função da variação da concentração de SSV ativos.	82

Figura 27 – Relação molar de cloro livre e SST. Concentração fixa de cloro livre de $42,60 \text{ mg.L}^{-1}$ dentro dos frascos e concentração de sólidos antes do contato com o cloro (g SST.L^{-1}), com volume total nos frascos de 250mL.96

LISTA DE SÍMBOLOS E NOMENCLATURA

Break Point – Ponto de inflexão;

CASAN - Companhia Catarinense de Águas e Saneamento;

DPD - N,N-dietil-p-fenilenediamina;

DQO – Demanda Química de Oxigênio ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$);

I - inibição da atividade (%);

IC50 - Concentração que inibe 50% da atividade celular;

P – Concentração de produto ($\text{mg N-NO}_x^-\cdot\text{L}^{-1}$);

r_p - Velocidade de formação de produto ($\text{mg N-NO}_x^-\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);

$-r_s$ - Velocidade de consumo de substrato ($\text{mg N-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);

S – Concentração de substrato ($\text{mg N-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$);

SST – Concentração de sólidos suspensos totais ($\text{g SST}\cdot\text{L}^{-1}$);

SSV – Concentração de sólidos suspensos voláteis ($\text{g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$);

T – Temperatura em °C;

t – Tempo (min);

TRH – Tempo de retenção hidráulica (dias);

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina;

X - Concentração de biomassa ($\text{g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$);

$Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em célula ($\text{mg células}\cdot(\text{mg N})^{-1}$);

μ_{s_0} - Velocidade específica de consumo de substrato do controle ($\text{mg N-NO}_3^-\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);

μ_s - Velocidade específica de consumo de substrato ($\text{mg N-NO}_3^-\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);

μ_{p_0} - Velocidade específica de formação de produto do controle ($\text{mg N-NO}_x^-\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);

μ_p - Velocidade específica de formação de produto ($\text{mg N-NO}_x^-\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
3.1	COLORO	29
3.1.1	<i>Reações com o cloro.....</i>	<i>30</i>
3.1.2	<i>Ação do cloro nos micro-organismos.....</i>	<i>35</i>
3.2	PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUAIS	37
3.2.1	<i>Nitrificação</i>	<i>37</i>
3.2.2	<i>Desnitrificação.....</i>	<i>41</i>
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	CULTIVO DE BACTÉRIAS.....	45
4.2	TESTES DE TOXICIDADE AGUDA	48
4.2.1	<i>Preparo dos inóculos.....</i>	<i>51</i>
4.2.2	<i>Avaliação da toxicidade aguda sobre a desnitrificação .</i>	<i>52</i>
4.2.3	<i>Avaliação da toxicidade aguda sobre a nitrificação</i>	<i>54</i>
4.2.4	<i>Avaliação da influência da concentração celular sobre a toxicidade do cloro</i>	<i>56</i>
4.3	CÁLCULOS	57
4.3.1	<i>Velocidades</i>	<i>57</i>
4.3.2	<i>Inibição.....</i>	<i>58</i>
4.4	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	59
4.4.1	<i>Análises por cromatografia iônica</i>	<i>59</i>
4.4.1.1	<i>Íons nitrato, nitrito e acetato</i>	<i>59</i>
4.4.2	<i>Análises colorimétricas</i>	<i>60</i>
4.4.2.1	<i>Nitrato.....</i>	<i>60</i>
4.4.2.2	<i>Nitrito.....</i>	<i>60</i>
4.4.2.3	<i>Amônio.....</i>	<i>60</i>

4.4.2.4	<i>Demanda Química de Oxigênio</i>	61
4.4.2.5	<i>Cloro livre</i>	61
4.4.3	<i>Sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV)</i>	62
4.4.4	<i>pH</i>	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	CULTIVO DE BACTÉRIAS	63
5.1.1	<i>Bactérias desnitrificantes</i>	63
5.1.2	<i>Bactérias nitrificantes</i>	65
5.2	TESTES DE TOXICIDADE AGUDA	67
5.2.1	<i>Avaliação da toxicidade aguda sobre a desnitrificação</i> .	67
5.2.2	<i>Avaliação da toxicidade aguda sobre a nitrificação</i>	73
5.2.3	<i>Avaliação da influência da concentração celular sobre a toxicidade do cloro</i>	77
6	CONCLUSÕES	98
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	100
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	ANEXOS	106

1 INTRODUÇÃO

Algumas indústrias químicas no Brasil, como a fabricação de fertilizantes, apresentam em suas correntes de efluentes quantidades significativas de sulfato de amônio, havendo necessidade de sua remoção antes do seu destino final. Em alguns casos estas correntes, além do íon amônio, possuem hipoclorito de sódio e pouca matéria orgânica disponível.

Existem alguns processos para remoção de nitrogênio em efluentes industriais. O processo convencional mais conhecido, que vem sendo aplicado em escala industrial, é a nitrificação e a desnitrificação heterotrófica. Na nitrificação, a amônia é oxidada a nitrito, seguida pela oxidação do nitrito a nitrato, promovido pelas bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente (CERVANTES, 2009; GERARDI, 2006; SCHMIDELL; REGINATTO, 2007). Na desnitrificação, várias bactérias heterotróficas participam do processo, sendo as do gênero *Pseudomonas* as mais frequentes, reduzindo nitrato a nitrogênio gasoso, na ausência de oxigênio (CERVANTES, 2009; GERARDI, 2006; SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Além de sua importância como um processo de tratamento de efluentes, o ciclo biogeoquímico do nitrogênio tem importância fundamental na natureza, sendo um bom indicador dos impactos causados pelo lançamento de poluentes em ambientes naturais.

Por ser um processo que envolve a atuação de bactérias, vários fatores podem interferir no processo (GERARDI, 2006), promovendo a diminuição da atividade biológica e resultando na diminuição da eficiência no tratamento das águas residuais.

Trabalhos relacionados à toxicidade do cloro sobre a microbiota envolvida no tratamento de efluentes ainda são bastante escassos, visto que o cloro reage com vários compostos como, por exemplo, compostos orgânicos, nitrito e amônia, sendo degradado antes de entrar nos processos biológicos, não havendo maiores efeitos sobre os mesmos. Porém, quando é utilizado cloro para limpeza de equipamentos e instalações, ou mesmo como agente oxidante para remoção de compostos poluentes, podem ocorrer concentrações elevadas na corrente do efluente e promover toxicidade ou inibição das bactérias utilizadas no tratamento biológico. O efeito crônico da aplicação de cloro nestas instalações é difícil de ser avaliado e não se tem maiores informações sobre o assunto.

Neste sentido, é importante avaliar a toxicidade aguda do cloro livre sobre as bactérias nitrificantes e desnitrificantes dando subsídios sobre o impacto deste agente oxidante em sistemas de tratamento biológico de efluentes industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda do cloro livre sobre as microbiotas redutoras de nitrato e oxidadoras de amônia, através da influência do mesmo sobre os processos biológicos de tratamento de efluentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Manter um reator desnitrificante e um nitrificante para produção de biomassa para utilizar em experimentos de toxicidade aguda;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do cloro sobre as bactérias no processo de desnitrificação, através de ensaios cinéticos em batelada;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do cloro sobre as bactérias no processo de nitrificação, através de ensaios cinéticos em batelada;
- ✓ Avaliar a influência da concentração celular sobre a toxicidade do cloro no processo de desnitrificação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CLORO

O cloro (Cl_2) é um gás amarelo e esverdeado (CETESB, 2012; LIBRARY OF MEDICINE, 2014), de densidade relativa ao ar de 4,486 a 0 °C e 2,491 a 20 °C e massa molecular de $70,9 \text{ g.mol}^{-1}$ (AZEVEDO NETTO, 1976; LIBRARY OF MEDICINE, 2014).

Quando comprimido a pressões superiores à sua pressão de vapor, o cloro se condensa em líquido, provocando liberação de calor e redução de volume em torno de 450 vezes. O transporte comercial de cloro normalmente é feito em cilindros pressurizados, pois possibilita essa redução do volume. No entanto, quando se necessita fazer a aplicação do cloro na forma gasosa, muitas vezes torna-se necessário suprir energia térmica para vaporizar o cloro líquido comprimido (CHERNICHARO et al., 2001).

A utilização do cloro é muito ampla.

“O cloro é utilizado na fabricação da resina plástica policloreto de vinila (PVC), solventes clorados, agrotóxicos, no branqueamento da polpa de celulose, no tratamento de água potável e de piscinas, e como intermediário na síntese química e em vários produtos químicos, como anticoagulantes, poliuretanos, lubrificantes, amaciadores de tecidos, fluidos para freios, fibras de poliéster, insumos farmacêuticos. O cloro líquido também tem aplicação como matéria-prima no processo produtivo do cloreto de hidrogênio (gás), precursor do ácido clorídrico (líquido a 37%), do hipoclorito de sódio e do dicloroetano”. (CETESB, 2012)

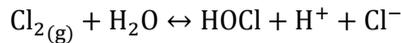
É mais conhecido como oxidante, branqueador e desinfetante. Segundo (AZEVEDO NETTO, 1976) é usado para desinfecção em várias formas:

- gasoso: apresentado na forma de cloro líquido, sofrendo uma evaporação antes da aplicação, e também aplicado na forma de dióxido de cloro;

- sólido: aplicado na forma de hipoclorito sódio;
- líquido: aplicado na forma de hipoclorito de cálcio.

3.1.1 Reações com o cloro

O cloro gasoso, introduzido na água, se hidrolisa de acordo com a Equação 1 (CHERNICHARO et al., 2001).



Equação 1

A ação desinfetante e oxidante do cloro é controlada pelo ácido hipocloroso (AZEVEDO NETTO, 1976), um ácido fraco. O ácido hipocloroso (HOCl) se dissocia instantaneamente em água formando íon hipoclorito (Equação 2).

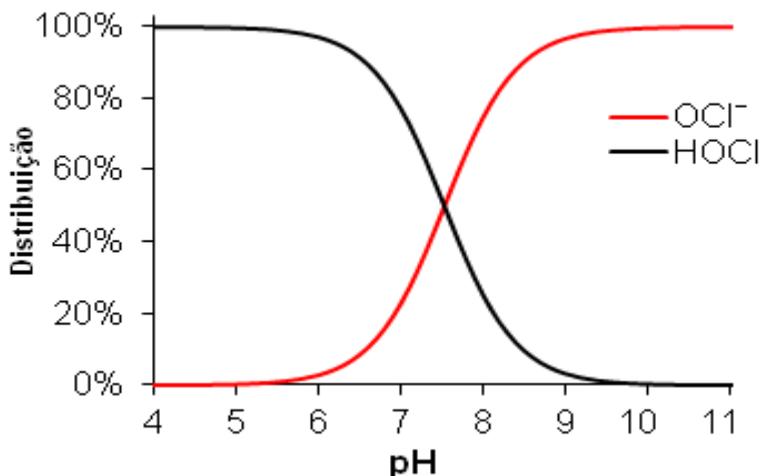


Equação 2

Na Equação 1, observa-se que há formação de ácido clorídrico, o qual não tem efeito oxidante. O ácido clorídrico formado combina-se com a alcalinidade natural da água ou com a alcalinidade introduzida para fim de tratamento, reduzindo-as e alterando dessa forma o pH o qual, por sua vez, influi no grau de dissociação do ácido hipocloroso (AZEVEDO NETTO, 1976). Segundo o mesmo autor, em solução aquosa e valores de pH inferiores a 6, a dissociação do ácido hipocloroso é fraca, sendo predominante a forma não dissociada (HOCl).

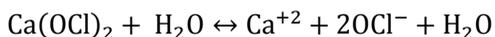
Em soluções de pH menor que 2, a forma predominante é o Cl_2 ; para valores de pH próximos a 5, a predominância é do HOCl, tendo o Cl_2 desaparecido. A forma ClO^- predomina em pH 10, como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Distribuição de HOCl e OCl⁻ em solução aquosa em função do pH. Gráfico produzido a partir do software CURTIPOOT (GUTZ, 2012).



Os efluentes industriais, em geral, apresentam valores de pH entre 5 e 10, quando as formas presentes são o ácido hipocloroso (HOCl) e o íon hipoclorito (OCl⁻). Por exemplo: para uma água de pH = 8 a 20°C tem-se 72% OCl⁻ e 28% HOCl (AZEVEDO NETTO, 1976).

O cloro é aplicado sob as formas de hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, que em contato com a água, também se ionizam (Equação 3 e Equação 4) (AZEVEDO NETTO, 1976; MEYER, 1994):



Equação 3

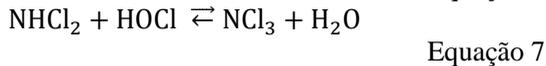
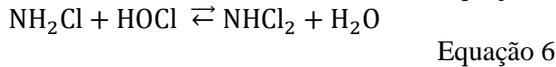
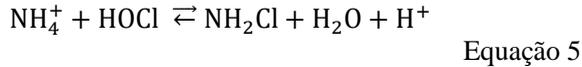


Equação 4

Quando existem, na água, amônia e compostos amoniacais, com a adição de cloro são formados compostos clorados ativos, denominados cloraminas. O cloro presente sob a forma de cloraminas é denominado cloro residual combinado.

O cloro sob a forma de ácido hipocloroso combina-se com a amônia e cloraminas nas formas inorgânicas formando monoclорamina (NH₂Cl) (Equação 5), dicloramina (NHCl₂) (Equação 6) e tricloramina

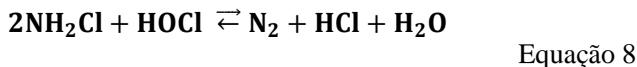
ou tricloreto de nitrogênio (NCl₃) (Equação 7) (AZEVEDO NETTO, 1976; CHERNICHARO et al., 2001; MEYER, 1994; USEPA; et al., 1994).



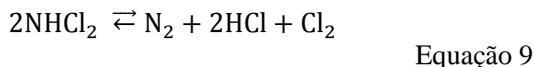
Estas reações dependem da relação entre o cloro dosado e o nitrogênio amoniacal presente, do pH, da temperatura e do tempo de reação. Elas ocorrem mais rapidamente em valores de pH mais baixos, onde é elevada a concentração de ácido hipocloroso não dissociado (AZEVEDO NETTO, 1976).

“Em pH 8,5 a monocloramina encontra-se em maior quantidade. Em pH 4,4, virtualmente, toda cloramina se encontra na forma de NCl₃. A presença de NCl₃ é responsável em parte pelo mau odor e gosto da água. Na faixa de 4,5 a 9,0 as mono e dicloraminas coexistem em variadas proporções. Por exemplo, entre 4,5 e 5,5, existe apenas dicloramina.” (AZEVEDO NETTO, 1976)

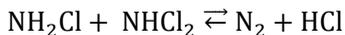
A monocloramina decompõe-se com o excesso de cloro segundo a Equação 8 (AZEVEDO NETTO, 1976).



A dicloramina se decompõe de acordo com a Equação 9. O Cl₂ formado hidroliza, formando ácido hipocloroso, como mencionado na Equação 1.



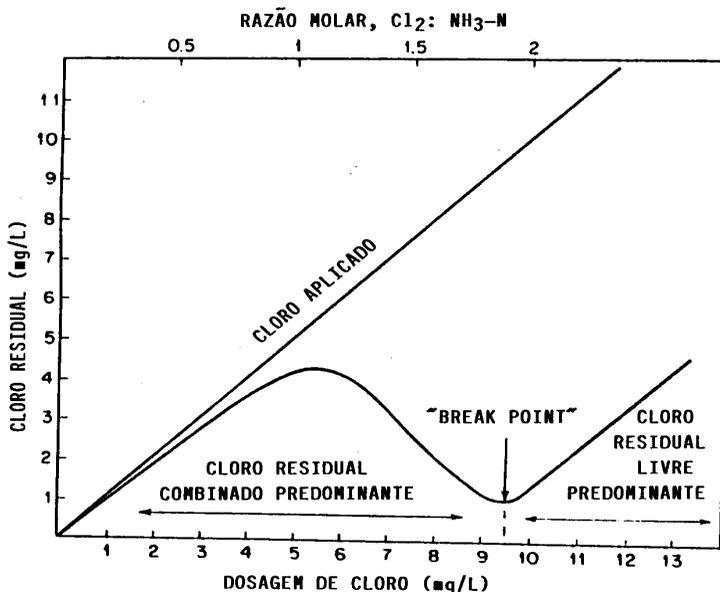
Quando existe monocloramina e dicloramina, na reação de decomposição (Equação 10) uma ou outra forma pode desaparecer dependendo da concentração inicial.



Equação 10

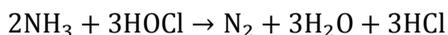
A Figura 2 representa o fenômeno que acontece quando o cloro é adicionado em águas com teor de nitrogênio amoniacal.

Figura 2 - Curva de cloro residual mostrando um "Break Point" típico. Conteúdo de nitrogênio amoniacal na água, 1,0 mg.L⁻¹. AZEVEDO NETTO (1976)



Observa-se que o cloro residual inicialmente aumenta com o aumento do cloro aplicado, passando por um máximo e, em seguida, diminui até um mínimo, chamado de ponto de inflexão (*Break Point*); a partir deste mínimo, o cloro residual, agora sob a forma de cloro residual livre, aumenta proporcionalmente com a quantidade de cloro aplicada.

No início da cloração, o nitrogênio amoniacal consome o cloro para a formação de cloraminas. O ponto máximo é atingido quando toda a amônia disponível se combinou com o cloro para a formação de cloraminas. Como são compostos quimicamente instáveis, quando a curva atinge o máximo, com a continuação da adição de cloro à água as cloraminas são oxidadas e destruídas, formando produtos inertes, como N_2 e HCl (Equação 11). O ponto mínimo de inflexão é atingido depois da destruição das cloraminas:



Equação 11

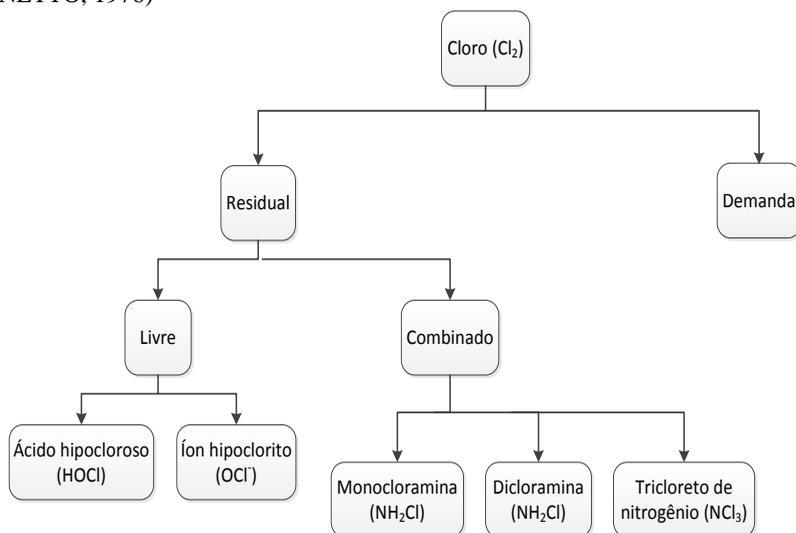
A adição de cloro após o ponto de inflexão aumenta a quantidade de cloro residual livre, já que toda a demanda de cloro pela água foi satisfeita.

Segundo AZEVEDO NETTO (1976), o cloro reage também com outros compostos, tais como ácido sulfúrico, íons Ferro II, íons manganês II e nitritos, agindo como agentes redutores. Muitas destas reações são bastante rápidas e por esta razão dificultam o uso do cloro como desinfetante. Por esse motivo, devem-se prever tais reações, pois haverá uma demanda de cloro antes que o mesmo exerça a ação desinfetante.

A demanda de cloro, calculada pela diferença entre a dose inicial e o residual de cloro, é proveniente dessa variedade de reações nas quais o cloro é consumido por vários constituintes da água residuária e por decomposição.

A Figura 3 esquematiza as formas que são encontradas de cloro. O cloro existente como forma de ácido hipocloroso, íon hipoclorito ou cloraminas é chamado de Cloro Residual.

Figura 3 – Formas encontradas de cloro em contato com águas. (AZEVEDO NETTO, 1976)



Vários autores relatam que o cloro livre inativa bactérias muito mais rápido do que cloraminas inorgânicas. Além disso, a atividade bactericida das cloraminas aumenta com a temperatura e a concentração de íons de hidrogênio. Segundo AZEVEDO NETTO (1976), as dicloraminas têm maior efeito bactericida do que as monocloraminas; já as tricloraminas não apresentam efeito desinfetante.

Apesar das cloraminas serem desinfetantes menos eficazes do que o cloro livre, elas parecem ser mais eficazes no controle de micro-organismos de biofilme, porque elas têm pouca interação com polissacarídeos capsulares (GERARDI, 2006).

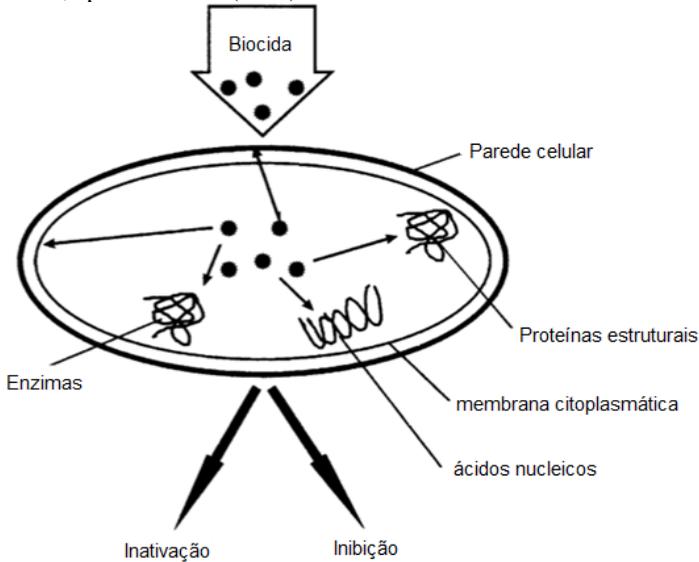
3.1.2 Ação do cloro nos micro-organismos

Como mencionado anteriormente, o cloro é usado no tratamento de águas como desinfetante e oxidante. Segundo AZEVEDO NETTO (1976), o uso do cloro como desinfetante serve para destruir ou dificultar o desenvolvimento de micro-organismos de significado sanitário (micro-organismos patogênicos, algas e bactérias ferro-redutoras). Segundo o mesmo autor, a ação oxidante tem como finalidade modificar as características químicas da água como, por

exemplo, na remoção de amônia e seus compostos, remoção de compostos orgânicos e inorgânicos oxidáveis. Deve-se ainda lembrar que em determinadas águas, parte do cloro pode ser consumido na ação oxidante e parte na ação desinfetante.

Diferentemente dos antibióticos que têm sítio de desinfecção específico, os biocidas, incluindo os desinfetantes, atuam mais amplamente nas células. Segundo RUSSEL, apud BITTON (2005), a ação de inativação (morte celular) e inibição dos biocidas atinge não apenas em um local, mas em vários alvos na célula microbiana, como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Locais alvos dos biocidas na célula microbiana. Adaptado de RUSSEL, apud BITTON (2005).



O cloro provoca danos consideráveis às células bacterianas, como perturbação na permeabilidade da célula (BERG; ROBERTS; MATIN, 1986; HAAS; ENGELBRECHT, 1980; KULIKOVSKY; PANKRATZ; SADOFF, 1975; LEYER; JOHNSON, 1997; VENKOBACHAR; IYENGAR; PRABHAKARA RAO, 1977), redução da síntese de proteínas (HAAS; ENGELBRECHT, 1980; VENKOBACHAR et al., 1977), danifica os ácidos nucleicos bacterianos (BITTON, 2005), bem como enzimas (CHERNICHARO et

al., 2001). Segundo AZEVEDO NETTO (1976), o cloro destrói uma enzima essencial ao metabolismo de micro-organismos (triosefosfato dihidrogenase), essencial na oxidação da glicose e, portanto na atividade do metabolismo celular.

Para que o cloro exerça os danos mencionados, ele deve entrar nas células bacterianas, mas isso apenas acontece quando ele estiver na sua forma solúvel (GERARDI, 2006). Além disso, a toxicidade também é afetada se o cloro é ionizado ou não ionizado. Segundo AZEVEDO NETTO (1976), o íon hipoclorito não apresenta ação bactericida devido a sua carga iônica, na qual impede sua entrada na célula.

Já o ácido hipocloroso, é o mais eficiente na inativação de micro-organismos em água e esgoto. No tratamento de água, com concentração de ácido hipocloroso menor que 1 mg.L^{-1} , o contato por 30 min é geralmente eficaz em reduzir significativamente o número de bactérias. Por exemplo, a *Campylobacter jejuni* apresenta mais de 99% de inativação em presença de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloro livre com o tempo de contato de 5 min (BLASER et al., 1986).

O tempo de contato é muito importante na ação do cloro frente aos micro-organismos, pois a morte de organismos por certo desinfetante, fixando-se os outros fatores, é proporcional à concentração de desinfetante e ao tempo de reação. Assim sendo, pode-se trabalhar com altas concentrações e curto tempo ou baixas concentrações e tempo elevado (AZEVEDO NETTO, 1976).

3.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUAIS

3.2.1 Nitrificação

Nitrificação é a oxidação biológica da amônia a nitrito, processo denominado nitrificação, seguido pela oxidação biológica do nitrito a nitrato, processo denominado nitratação, com oxigênio como acceptor de elétrons.

As equações estequiométricas para as etapas de nitrificação, nitratação, e para a reação global de nitrificação são descritas pelas Equações 12, 13 e 14, respectivamente. (CERVANTES, 2009; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997; SCHMIDELL; REGINATTO, 2007)



Equação 12

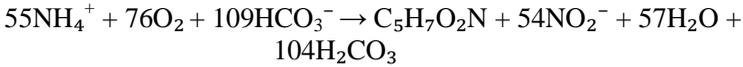


Equação 13

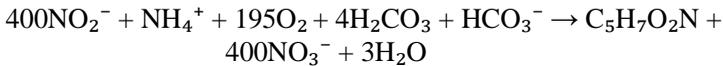


Equação 14

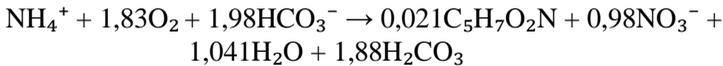
CERVANTES (2009) ainda propõe algumas reações envolvidas no processo de nitrificação que ponderam a assimilação dos substratos no crescimento celular, como mostram as Equações 15, 16 e 17.



Equação 15



Equação 16



Equação 17

A oxidação do íon amônio é promovida pela ação das bactérias aeróbias dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio* e outros, as quais se encontram amplamente distribuídas na natureza, tanto em sistemas aquáticos como terrestres, com propriedades de tolerância ao cloreto de sódio, capacidade de hidrolisar a ureia e afinidade pelo amônio (ETCHEBEHERE, 2007).

A nitratação é promovida pela ação das bactérias do gênero *Nitrobacter*, *Nitrospina gracilis*, *Nitrococcus mobilis* e *Nitrospira*, dentre outros (ETCHEBEHERE, 2007).

As bactérias nitrificantes oxidam amônia a fim de obter energia para o metabolismo celular. Pouca energia é obtida a partir da nitrificação, proporcionando um crescimento bacteriano relativamente pequeno. O fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), calculado através das Equações 15 e 16, é de, 0,15 g células.(g N-

NH_4^+)⁻¹ oxidado e de, 0,02 g células.(g N- NO_2^-)⁻¹ oxidado, respectivamente.

As bactérias nitrificantes são quimiolitotróficas e autotróficas, isto é, obtém energia celular por oxidação de um mineral como o nitrogênio e carbono para a síntese celular através do consumo de carbono inorgânico (CO_2).

O dióxido de carbono é obtido a partir do bicarbonato (HCO_3^-), isto é, o dióxido de carbono dissolvido em água forma o ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia para formar alcalinidade do bicarbonato (Equação 18):



Equação 18

A partir da Equação 17, também pode ser estimado o consumo de bicarbonato de sódio de 11,87 mg NaHCO_3 .(mg N- NH_4^+)⁻¹ oxidado, havendo consumo de alcalinidade apenas na etapa de nitrificação. O esgotamento da alcalinidade pela oxidação da amônia acarreta quedas bruscas no pH, causando redução rápida nas velocidades de reação em valores de pH abaixo de 7,0, muitas vezes inibindo o processo (BRESSAN, 2012).

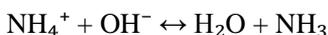
As bactérias nitrificantes são estritamente aeróbias, na qual a nitrificação só ocorre na presença de oxigênio molecular livre (O_2). De acordo com a Equação 15 e Equação 16, o consumo de oxigênio é de 3,16 mg O_2 .(mg N- NH_4^+)⁻¹ oxidado a nitrito e 1,11 mg O_2 .(mg N- NO_2^-)⁻¹ oxidado a nitrato, portanto, para a nitrificação completa esta relação é de 4,18 mg O_2 .(mg N- NH_4^+)⁻¹.

Como todos os processos biológicos, a nitrificação é afetada por fatores ambientais como temperatura, pH, concentração de substratos e inibidores. Esses fatores afetam a velocidade de nitrificação e, como consequência, a velocidade de crescimento das bactérias nitrificantes (CERVANTES, 2009). Bactérias nitrificantes são ativas e se reproduzem numa faixa de temperatura de 5°C a 40°C. No entanto, a temperatura ideal para a nitrificação no processo de lodos ativados é 30°C. Nesta temperatura ocorre a máxima atividade e, conseqüentemente, menor tempo de geração para as Nitrosomonas, uma das principais bactérias nitrificantes.

Em temperaturas baixas (< 20°C) a nitratação é muito mais rápida que a nitrificação, de modo que se pode considerar que a nitratação é

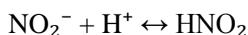
imediate e a acumulação de nitrito sempre será muito pequena em sistemas sob condições estacionárias (VAN HAANDEL; KATO; VON SPERLING, 2009). O contrário acontece em temperaturas elevadas (> 25°C), onde a nitrificação é mais rápida que a nitratação, e por esta razão pode haver acumulação de nitrito quando se cria condições adequadas (VAN HAANDEL et al., 2009).

Em meio aquoso o nitrogênio amoniacal encontra-se em uma condição de equilíbrio entre o íon amônio (NH_4^+) e amônia livre (NH_3) (Equação 19), sendo que o pH determina as proporções entre amônia ionizada e não ionizada no equilíbrio químico.



Equação 19

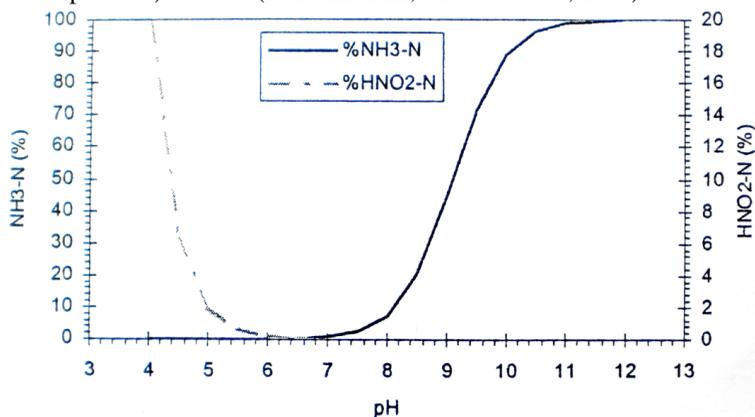
O que ocorre também com os equilíbrios entre o nitrito (NO_2^-) e ácido nitroso (HNO_2). Em pH reduzido o nitrito é convertido em ácido nitroso (Equação 20).



Equação 20

O equilíbrio entre a amônia livre e o ácido nitroso livre pode ser observado na Figura 5, na qual é formada através de equações em que são possíveis calcular as suas quantidades em distintos valores de pH e distintas temperaturas. (ANTHONISEN et al., 1976)

Figura 5 - Porcentagem de amônia livre ($\text{NH}_3\text{-N}$) (em relação ao total de N presente) e porcentagem de ácido nitroso ($\text{HNO}_2\text{-N}$) (em relação à quantidade de nitrito presente) a 30°C . (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007)



Segundo WIESMANN (1994), há possibilidade de que a amônia livre é o verdadeiro substrato da nitrificação. No entanto, como pode ser visto, em valores de pH entre 7,5 e 8, a quantidade de amônia livre é baixa. Porém, acima de 8 esta quantidade é mais elevada, podendo ocorrer inibição na nitrificação visto que é a substância mais tóxica para as bactérias. Já em pH abaixo de 7, a presença de amônia livre é muito baixa, o que pode limitar a atividade das bactérias.

Quanto à presença de ácido nitroso, também um inibidor da ação das bactérias, pode-se observar que sua presença é praticamente nula em pH entre 7 e 8. Abaixo de 6, há um aumento acentuado, no qual pode provocar uma intensa inibição no sistema biológico.

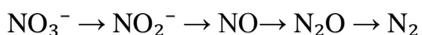
A faixa de pH no qual as bactérias nitrificantes têm atividade é de 5 a 8,5. Segundo SCHMIDELL; REGINATTO (2007), a máxima atividade microbiana é obtida nas condições de pH igual a 8.

3.2.2 Desnitrificação

A desnitrificação é um processo onde, na ausência de oxigênio molecular e na presença de doadores de elétrons, bactérias heterotróficas facultativas reduzem nitrato a gás nitrogênio.

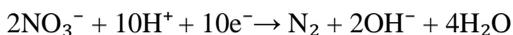
A desnitrificação procede em quatro etapas sequenciais de redução (PAINTER, 1970) (Equação 21), havendo cinco moléculas nitrogenadas e quatro etapas bioquímicas envolvidas. As moléculas são:

nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e de nitrogênio molecular (N_2), os quais possuem estado de oxidação +5, +3, +2, +1, e 0, respectivamente. O nitrato sempre é um substrato inicial de energia, enquanto que o nitrito pode ser um substrato inicial ou um composto intermediário. O óxido nítrico e o óxido nitroso são os compostos intermediários, enquanto que o nitrogênio molecular é o produto final.

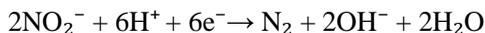


Equação 21

Segundo, Khin e Annachhatre, 2004, a desnitrificação envolve as reações apresentadas pela Equação 22 e Equação 23.



Equação 22



Equação 23

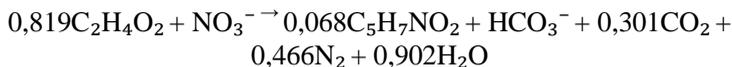
As bactérias desnitrificantes são anaeróbias facultativas capazes de utilizar tanto o oxigênio dissolvido, nitrato ou nitrito para degradar a fonte de carbono solúvel, a fim de obter o carbono e energia para crescimento e atividade celular. Segundo GERARDI (2006), existem vários gêneros de bactérias que contêm espécies de bactérias desnitrificantes (Tabela 1). Segundo o mesmo autor, os gêneros que contêm a maioria das espécies de bactérias desnitrificantes incluem *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Pseudomonas*.

Tabela 1 – Gêneros de bactérias que contêm espécies desnitrificantes

<i>Achromobacter</i>	<i>Hyphomicrobium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Kingella</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Methanonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Denitrobacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Gluconobacter</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Holobacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>

O enriquecimento e isolamento dessas bactérias são possíveis pela utilização de meios sintéticos, contendo nitrato e alguma substância orgânica como etanol, metanol, acetato, succinato ou benzoato (MADIGAN et al., 1997).

De acordo com MATEJU et al. (1992), a Equação 24 apresenta uma boa relação estequiométrica para a desnitrificação, levando em consideração a biomassa produzida e utilizando o acetato como doador de elétrons. Segundo esse autor, a relação estequiométrica entre a fonte de C e N é 3,51 g ácido acético.(g N-NO₃⁻)⁻¹, ou 3,74 g DQO.(g N-NO₃⁻)⁻¹.



Equação 24

Também se pode observar na Equação 24 que a desnitrificação produz alcalinidade, de modo que cerca de 50% da alcalinidade consumida durante a nitrificação é retornada para o processo através de desnitrificação (GERARDI, 2006).

Grande parte da energia obtida a partir da degradação de matéria orgânica é utilizada para a síntese celular, isto é, a produção de novas células bacterianas (C₅H₇O₂N) (equação proposta por HOOVER; PORGES (1952)). Segundo GERARDI (2006), quanto menos carbono da matéria orgânica é assimilado por novas células bacterianas, quando

nitrito é usado para degradar a matéria orgânica, mais dióxido de carbono é produzido. Grande parte do dióxido de carbono que é produzido não se dissolve no meio aquoso.

Dentre os gases produzidos durante a desnitrificação, apenas três gases são liberados para a atmosfera a partir do efluente, N_2 , CO_2 , N_2O , sendo a maioria de nitrogênio molecular e dióxido de carbono. Segundo GERARDI (2006), geralmente estes gases com o óxido nitroso ficam retidos nas partículas de flocos e contribuem para problemas de sedimentação do lodo antes de escaparem para a atmosfera.

A desnitrificação é influenciada por três fatores operacionais significativos, entre eles, o pH, a temperatura e os nutrientes.

A operação deve ser realizada em valores elevados de pH, pois para valores abaixo de 7 ocorre produção mais acentuada de óxidos de nitrogênio, altamente tóxicos. Além disso, para valores baixos de pH, caso haja a presença de nitrito, haverá elevadas concentrações de ácido nitroso.

A dependência da desnitrificação com o pH é muito menos acentuada do que a da nitrificação, de modo que, quando há condições de pH favoráveis para nitrificação, a desnitrificação também se desenvolverá bem (VAN HAANDEL et al., 2009).

As condições mais favoráveis para a desnitrificação são pH no valor 8 e temperatura de 35°C. A taxa de desnitrificação aumenta com a temperatura até o valor de 40°C. Além disso, o aumento da temperatura do efluente resulta em menos afinidade com o oxigênio dissolvido, tornando a desnitrificação mais rápida. Segundo GERARDI (2006), sua inibição ocorre a partir de temperaturas menores que 5°C.

Outra condição importante para que a desnitrificação aconteça, além do pH e temperatura, é a ausência de oxigênio. Dependendo da concentração de oxigênio dissolvido, pode ocorrer inibição completa da desnitrificação, para concentrações na ordem de 0,2 mg.L⁻¹ para culturas puras. Para sistemas de lodos ativados a desnitrificação pode ser inibida em concentrações de 0,3 a 1,5 mg.L⁻¹, havendo crescimento aglomerado das células na forma de flocos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DE BACTÉRIAS

INÓCULO

Os inóculos de bactérias utilizados nos experimentos foram cedidos pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento – CASAN, de Florianópolis, provenientes de sua estação de tratamento de esgoto, unidade Centro. Foram utilizados inóculos de bactérias desnitrificantes e nitrificantes, que foram aclimatados separadamente em laboratório utilizando meios de cultura sintéticos modificados a partir de CAMPOS et al. (1999).

MEIO DE CULTIVO

As bactérias desnitrificantes foram cultivadas em meio contendo fonte de nitrogênio na forma de nitrato e carbono orgânico na forma de acetato, na relação mássica de DQO/N de 3,744, calculada a partir da Equação 24. Já, no meio sintético para cultivo das bactérias nitrificantes foi utilizado amônia como substrato e bicarbonato de sódio como fonte de carbono e alcalinidade na relação de 11,87 mg NaHCO₃.(mg N-NH₄⁺)⁻¹, calculada a partir da Equação 17.

Desta forma, o meio sintético sugerido por CAMPOS et al. (1999) foi adaptado para cada grupo de bactérias, conforme Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2 - Composição do meio sintético para bactérias desnitrificantes

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Compostos	Concentração (mg.L ⁻¹)		
NaNO ₃	607,1	2.428,6	4.857,1
KH ₂ PO ₄	250,0	250,0	250,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	42,3	347,0	694,0
NaCl	1.000,0	1.000,0	1.000,0
Solução de micronutrientes (*) (mL.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5
CH ₃ COONa	479,7	1918,8	3.837,6

(*) Preparada conforme Tabela 4.

Tabela 3 - Composição do meio sintético para bactérias nitrificantes

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Compostos	Concentração (mg.L ⁻¹)		
(NH ₄) ₂ SO ₄	46,5	186,1	372,2
NH ₄ Cl	344,1	1376,6	2753,2
KH ₂ PO ₄	250,0	250,0	250,0
MgCl ₂ . 6H ₂ O	101,3	101,3	101,3
NaCl	1.000,0	1.000,0	1.000,0
Solução de micronutrientes (*) (mL.L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5
NaHCO ₃	1.187,0	4.748,0	9.496,0

(*) Preparada conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Solução de micronutrientes (VISHNIAC; SANTER, 1957)

Compostos	Concentração (g.L ⁻¹)
EDTA.2H ₂ O	55,35
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,10
MnCl ₂ .4H ₂ O	5,06
ZnSO ₄ .7H ₂ O	21,99
CaCl ₂ .2H ₂ O	7,34
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,61
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,99

SISTEMA OPERACIONAL

No sistema de cultivo das bactérias desnitrificantes foi utilizado um recipiente de plástico fechado para garantir a ausência de oxigênio e uma bomba submersa para aquário da marca Sarlo modelo S300, com vazão de 180 L.h⁻¹ e potência de 7 watts, para manter a agitação do líquido. Já, as bactérias nitrificantes aeróbias foram mantidas em um recipiente de plástico com aeração através de um sistema de compressor de ar (*Big Air* modelo A420; potência de 6 watts) com as saídas conectadas à duas mangueiras de silicone ligadas a pedras porosas dispostas no fundo do recipiente (Figura 6).

Figura 6 - Sistema utilizado para enriquecimento da biomassa. Reator nitrificante à esquerda e desnitrificante à direita.



O enriquecimento das bactérias desnitrificantes e nitrificantes foi operado da mesma forma, em três etapas, conforme Tabela 5. Para partida dos reatores foram utilizadas inicialmente uma carga volumétrica de $20 \text{ mg N.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Etapa 1), sendo feita uma progressão de carga subsequentes nas Etapas 2 e 3, com o objetivo de aumentar a produção de biomassa dentro dos reatores.

Tabela 5 – Operação de aclimação dos inóculos

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Concentração de alimentação (mg N.L ⁻¹)	100	400	800
Periodicidade da alimentação	Diária	3 vezes por semana	3 vezes por semana
Volume do reator (L)	10	4	4
Período de análises (por semana)	3 vezes	1 vez	1 vez
Volume relativo de troca nas alimentações (L)	20%	25%	25%
TRH (dias)	5,00	9,32	9,32
Carga (mg N.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	20,00	42,92	85,84

O monitoramento analítico foi realizado seguindo a periodicidade informada na Tabela 5. Para isso, decantava-se a biomassa de cada reator e coletava-se uma amostra de 25 mL do sobrenadante. Em seguida, as amostras eram filtradas em papel filtro Qualy, com diâmetro de 9 cm, medido o pH e eram realizadas análises colorimétricas de nitrato, nitrito, amônio e DQO.

4.2 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

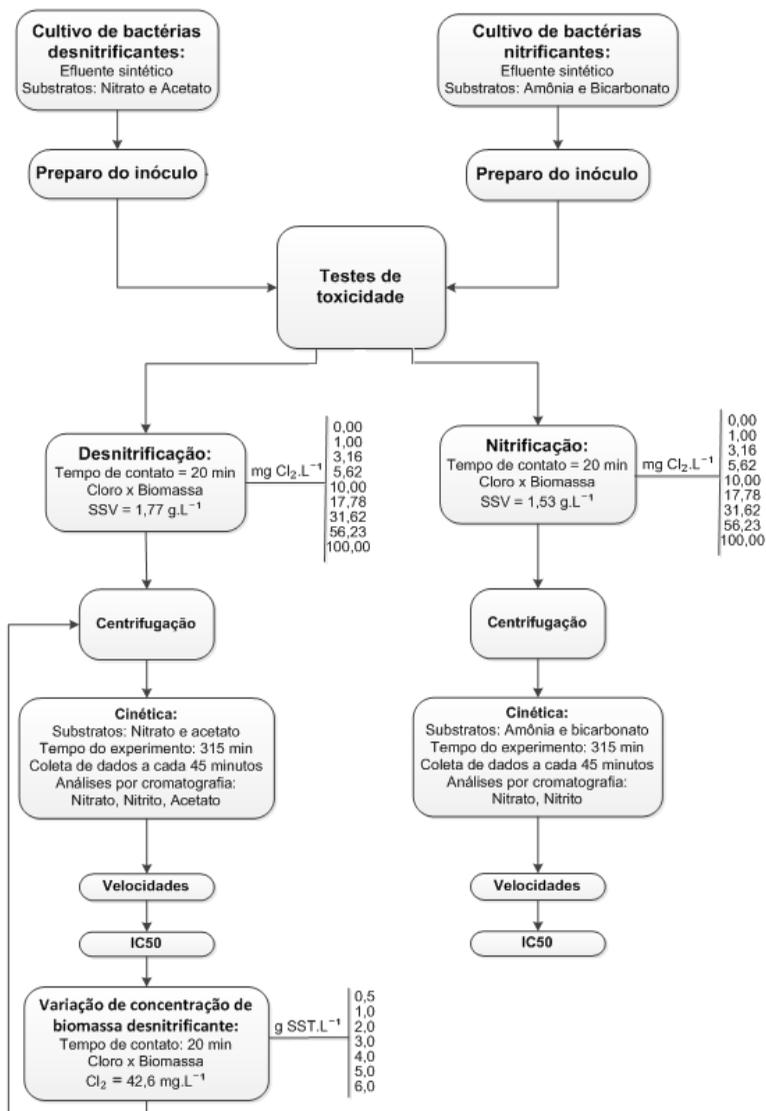
Nos testes de toxicidade, alguns testes preliminares foram feitos com a exposição do hipoclorito de sódio sobre as bactérias desnitrificantes. No entanto, não foi obtido sucesso nestes ensaios devido ao fato do cloro mascarar os resultados, pois o mesmo reage imediatamente com o nitrito (AZEVEDO NETTO, 1976; GERARDI, 2006) e com a matéria orgânica disponível no meio, modificando tanto a disponibilidade de substrato para as células como a concentração final de cloro no meio reacional. Nesta tentativa de adicionar o cloro durante o ensaio cinético de desnitrificação, observou-se a oxidação do nitrito a nitrato e a oxidação do acetato.

Desta forma, optou-se pela exposição do cloro à biomassa antes da cinética de consumo dos substratos. Iniciou-se com a lavagem da biomassa com um meio de sais e tampão e, posteriormente, colocadas em frascos num agitador orbital (Shaker Orbital Tecnal, modelo TE420) com controle de temperatura. Em seguida, foi realizado o contato da

biomassa com várias concentrações diferentes de cloro por 20 minutos. Após o contato, a biomassa remanescente em cada frasco foi recuperada por centrifugação para a remoção do cloro. Com a biomassa recuperada foi iniciado o ensaio cinético para avaliação da atividade metabólica das bactérias remanescentes. As etapas realizadas e suas respectivas condições metodológicas aplicadas estão descritas nos itens subsequentes e representadas esquematicamente pelo diagrama da Figura 7.

Além destes, foi realizado um experimento preliminar para determinar a faixa de concentração ideal para a realização dos ensaios de inibição do cloro na cinética de desnitrificação, onde foram utilizadas concentrações de cloro livre de 0,0, 120,5, 240,9, 562,2, 803,1 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. As condições destes ensaios foram as mesmas do ensaio de toxicidade realizado em bactérias desnitrificantes descritos no item 4.2.2. Para todas as concentrações, exceto para o controle negativo sem Cl_2 , atingiu-se inibição completa da atividade microbiana (Anexo 2, Figura 3). Desta forma, optou-se pela faixa de concentração de cloro livre mencionada no diagrama (0 a 100 mg $\text{Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e detalhada no item 4.2.2.

Figura 7 – Diagrama de representação da metodologia aplicada aos ensaios de toxicidade.



4.2.1 Preparo dos inóculos

Antes dos ensaios de toxicidade, a biomassa utilizada passou pelo procedimento de lavagem para remoção de substratos residuais. A biomassa foi lavada com meios de cultura descritos na

Tabela 6 e na Tabela 7, dissolvidos em tampão fosfato. O tampão fosfato foi utilizado para manter o pH do experimento próximo de 7,4. A solução tampão foi preparada a partir de fosfato de potássio e hidróxido de sódio para pH 7,4 conforme descrito por MORITA; ASSUMPCÃO (1972).

As soluções para lavagem da biomassa foram adaptações feitas do meio sugerido por (CAMPOS et al., 1999). Foram retirados os substratos, como fonte de nitrogênio, carbono e alcalinidade e mantidos apenas os sais.

Na solução de lavagem da biomassa nitrificante, foi retirado o KH_2PO_4 para manter o controle do pH com a solução tampão, pois o composto contido no meio estava alterando o pH pré-definido. Também foi substituído o sulfato de magnésio pelo cloreto de magnésio devido que o substrato adicionado como fonte de nitrogênio também continha sulfato e para não haver uma quantidade maior de sulfato optou-se por essa modificação.

Tabela 6 - Concentrações dos sais para lavagem da biomassa desnitrificante, dissolvidos em tampão fosfato de potássio e hidróxido de sódio em pH 7,4.

Compostos	Concentração (mg.L^{-1})
KH_2PO_4	250,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	433,77
NaCl	1000,00
Solução de micronutrientes (*) (mL.L^{-1})	0,50

(*) Preparada conforme Tabela 4.

Tabela 7 - Concentrações dos sais para lavagem da biomassa nitrificante, dissolvidos em tampão fosfato de potássio e hidróxido de sódio em pH 7,4.

Compostos	Concentração (mg.L^{-1})
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	101,33
NaCl	1000,00
Solução de micronutrientes (*) (mL.L^{-1})	0,50

(*) Preparada conforme Tabela 4.

4.2.2 Avaliação da toxicidade aguda sobre a desnitrificação

Na primeira etapa deste experimento foi promovido o contato da biomassa desnitrificante com o hipoclorito de sódio. Foram utilizados 9 frascos de vidro e adicionado 250 mL de biomassa lavada a 1,77 g SSV.L⁻¹ em cada frasco (0,44 g SSV).

Em seguida tomou-se diferentes alíquotas de hipoclorito de sódio P.A. e diluído em água para posterior adição de 5 mL de solução nos frascos. Os cálculos foram planejados para que dentro dos frascos contivessem concentrações conhecidas de cloro, conforme estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações de hipoclorito de sódio adicionadas no teste de toxicidade.

Frascos	Concentração de cloro livre dentro dos frascos (mg Cl ₂ .L ⁻¹)
1	0,00
2	1,00 (10 ⁰)
3	3,16 (10 ^{0,5})
4	5,62 (10 ^{0,75})
5	10,00 (10 ¹)
6	17,78 (10 ^{1,25})
7	31,62 (10 ^{1,5})
8	56,23 (10 ^{1,75})
9	100,00 (10 ²)

As concentrações de cloro foram baseadas na variação de 0 a 2 na potência 10 para a identificação da faixa logarítmica de inibição do cloro e determinação do IC50 (concentração necessária para inibir em 50% a atividade microbiana) após a cinética, na segunda etapa.

Foi realizado o contato entre a biomassa e o cloro por 20 minutos e, em seguida, a solução foi centrifugada a 3.400 RPM em centrífuga de marca Quimis, modelo QA222TM-O4 de raio 15,5 cm. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e a biomassa contida no fundo dos tubos Falcon foi submetida à solução de lavagem (Tabela6) e centrifugado novamente, para não haver presença de cloro na próxima etapa.

Na segunda etapa, a biomassa remanescente em cada frasco foi avolumada a 500 mL com solução de sais (Tabela 6) acrescidos de

NaNO_3 e $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ de modo a obter uma concentração final de 500 mg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ e 1726 mg $\text{CH}_3\text{COO}^- \cdot \text{L}^{-1}$, resultando em uma relação mássica DQO/N de 3,744.

Os frascos foram incubados à temperatura constante de 35°C e agitados a 126 RPM em um Shaker Orbital Tecnal, modelo TE420. Os mesmos foram mantidos em anaerobiose com adição de gás argônio e lacrados com tampa de borracha. Foi utilizado um sistema de mangueiras para a retirada das amostras, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Sistema utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade aguda sobre bactérias desnitrificantes.



A cada 45 minutos foram coletadas amostras de 15 mL e centrifugadas por 10 minutos a 3.400 RPM (2000 x g) em centrífuga (marca Quimis, modelo QA222TM-O4). Posteriormente o sobrenadante foi filtrado utilizando filtros para seringas com diâmetro dos poros de

0,2 µm e, em seguida, foi medido o pH. As amostras foram então armazenadas para posterior análise dos compostos nitrogenados na forma de nitrato e nitrito, e análise do íon acetato. O tempo final do experimento foi de 5,25 horas, totalizando em 8 pontos de amostragem para cada concentração de cloro adicionado.

Apenas na coleta das amostras do tempo zero de experimento foi realizado análise de SST e SSV, visto que anteriormente cada frasco foi mantido em contato com concentrações crescentes de hipoclorito.

4.2.3 Avaliação da toxicidade aguda sobre a nitrificação

Na primeira etapa deste experimento foi promovido o contato da biomassa nitrificante com o hipoclorito de sódio. Foram utilizados 9 frascos de vidro e adicionado 250 mL de biomassa lavada a 1,53 g SSV.L⁻¹ em cada frasco. Em seguida foi adicionado 5 mL de diferentes soluções de hipoclorito de sódio, conforme descrito no item 4.2.2 e concentrações apresentadas na Tabela 8.

O contato do cloro com a biomassa foi mantido também por 20 minutos e, em seguida, a solução foi centrifugada a 3.400 RPM em centrífuga de marca Quimis, modelo QA222TM-O4 de raio 15,5 cm. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e a biomassa contida o fundo dos tubos Falcon foi submetida à solução de lavagem, Tabela 7 e centrifugado novamente.

Na segunda etapa, a biomassa remanescente em cada frasco foi avolumada para 250 mL com solução de sais (Tabela 7) acrescidos de: 125mL de solução tampão fosfato descrito por MORITA; ASSUMPCÃO (1972), concentrado duas vezes; 125 mL de uma solução contendo sais (Tabela 7) concentrada duas vezes e uma solução contendo (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl e NaHCO₃ sem adição de tampão fosfato, apenas água destilada. A solução em cada frasco resultou em 500 mL com concentrações de 300 mg N-NH₃. L⁻¹ e o bicarbonato de sódio a 654,50 mg.L⁻¹.

O bicarbonato de sódio não foi adicionado na quantidade estequiométrica para oxidação de toda a amônia disponibilizada, conforme estequiometria apresentada na Equação 17, devido que com esta quantidade não se tinha o controle do pH no decorrer da nitrificação. Deste modo, utilizou-se a Equação 15 para calcular a quantidade de bicarbonato necessária apenas para suprir o carbono inorgânico necessário ao crescimento celular, resultando deste modo em

uma maior estabilidade do pH. A estequiometria desta equação é de 55 moles de N para 5 moles de C ($C_5H_7O_2N$), sendo que para a concentração de nitrogênio de $300 \text{ mg N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ resulta em $163,6366 \text{ mg NaHCO}_3$, isto é, quantidade de carbono suficiente para o crescimento celular na nitrificação. Esta quantidade foi multiplicada por 4 para garantir uma quantidade suficiente de bicarbonato, visto que o mesmo também é consumido na nitratação.

Os frascos foram incubados à temperatura constante de 30° , pH inicial de 7,4 e agitação a 150 RPM em um Shaker Orbital Tecnal, modelo TE420. Manteve-se os frascos abertos para manter a transferência de oxigênio no líquido, como mostra a

Figura 9

Figura 9 - Sistema utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade sobre bactérias nitrificantes.



No ponto zero do experimento foram feitas análises de SST e SSV em cada frasco. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 15 mL de cada frasco a cada 45 minutos até o tempo de 315 minutos. Foi medido

o pH (Anexo 3 – Tabela 2 e Figura 5) de cada amostra e posteriormente realizado análises de nitrito e nitrato em duplicata por cromatografia. Foi feito a média das análises para cada composto e somado os resultados dos dois produtos.

4.2.4 Avaliação da influência da concentração celular sobre a toxicidade do cloro

Neste experimento, optou-se pela utilização da biomassa desnitrificante uma vez que a quantidade de biomassa nitrificante disponível era bastante limitada. Além disso, imagina-se que a influência da variação da biomassa sobre a magnitude da inibição pelo cloro seja similar para ambas as culturas.

Na primeira etapa foram utilizados 7 frascos de vidro com 250 mL de biomassa com concentração celular de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, e 6,0 g SST.L⁻¹ e promovido o contato com hipoclorito de sódio à concentração final nos frascos de 42,60 mg Cl₂.L⁻¹ (valor da IC50 encontrada no experimento do item 5.2.1). O contato foi mantido por 20 minutos sob agitação constante e, em seguida, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 3.400 RPM em centrífuga de marca Quimis, modelo QA222TM-O4 de raio 15,5 cm. Foi aplicado novamente a centrifugação para a retirada completa do cloro, lavando a biomassa com solução de lavagem, Tabela 6..

Na segunda etapa, a biomassa remanescente em cada frasco foi avolumada a 500 mL com solução de sais (

Tabela 6) acrescidos de NaNO₃ e CH₃COONa.3H₂O de modo a obter uma concentração final de 500 mg N-NO₃⁻. L⁻¹ e 1726 mg CH₃COO⁻.L⁻¹, resultando em uma relação mássica DQO/N de 3,744.

Os frascos foram lacrados com tampa de borracha e desaerados com adição de gás argônio e mantidos sob agitação constante em Shaker Orbital Tecnal, modelo TE 420 a 150 RPM e temperatura de 35°C.

A cada 45 minutos foram coletados amostras de 15 mL e centrifugadas por 10 minutos a 3.400 RPM (2000 x g) em centrífuga de marca Quimis, modelo QA222TM-O4. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado utilizando filtros para seringa com diâmetro dos poros de 0,2 µm e em seguida medido o pH. As amostras foram armazenadas para posterior análise dos compostos nitrogenados na forma de nitrato e nitrito, e análise do íon acetato. O experimento foi realizado em 5,25

horas, totalizando 8 pontos de amostragem para a obtenção dos resultados.

Como na primeira etapa o cloro esteve em contato com várias concentrações de biomassa, no ponto zero de cinética foi realizada a análise de SST e SSV.

4.3 CÁLCULOS

4.3.1 Velocidades

Para o cálculo das velocidades de consumo e formação dos compostos foi considerado o balanço de massa de um reator descontínuo ideal, considerando que os frascos estavam espacialmente homogêneos de forma que as propriedades físicas e químicas do meio eram iguais em todo o reator.

Considerou-se que durante a realização dos ensaios a massa total do sistema permaneceu constante, isto é, tanto o volume como a densidade do meio permaneceram constantes. Além de que os ensaios foram realizados em tempo relativamente curtos, no qual se considerou morte celular irrelevante. A seguir são definidas a velocidade de consumo de substrato (Equação 25) e velocidade de formação de produto (Equação 26).

$$r_s = \frac{-dS}{dt}$$

Equação 25

$$r_p = \frac{dP}{dt}$$

Equação 26

sendo: S = concentração de substrato (íon nitrato, na desnitrificação) em mg N-NO₃⁻.L⁻¹; t = tempo em min; r_s = velocidade de consumo de substrato S em mg N-NO₃⁻.L⁻¹.min⁻¹; P = concentração de produto (na nitrificação o somatório dos íons nitrito e nitrato) em mg N-NO_x⁻.L⁻¹ e r_p = velocidade de formação de produto P em mg N-NO_x⁻.L⁻¹.min⁻¹.

Nos ensaios de toxicidade de desnitrificação foi acompanhada a variação da concentração dos substratos (íons nitrato e acetato) e a variação da concentração do produto (íon nitrito), e na nitrificação foi acompanhada a variação de formação dos produtos (somatório dos íons

nitrito e nitrato) ao longo do tempo. Estas concentrações foram plotadas em um gráfico em função do tempo e obtiveram-se as velocidades globais a partir dos coeficientes angulares das retas formadas.

A fase lag foi despresada no início da curva formada, selecionando os pontos suficientes para a obtenção das velocidades.

Posteriormente obteve-se a velocidade específica de consumo de substrato (Equação 27), e a velocidade específica de formação de produtos (Equação 28).

$$\mu_s = \frac{-r_s}{X}$$

Equação 27

$$\mu_p = \frac{r_p}{X}$$

Equação 28

sendo: μ_s = velocidade específica de consumo de substrato S em mg N-NO₃⁻.gSSV⁻¹.min⁻¹; X = concentração de biomassa em gSSV.L⁻¹ e μ_p = velocidade específica de formação de produto em mg N-NO_x⁻.g SSV⁻¹.min⁻¹.

4.3.2 Inibição

A inibição da atividade da biomassa foi calculada seguindo a Equação 29, para o experimento de toxicidade sobre bactérias desnitrificantes e para o experimento de toxicidade sobre as bactérias nitrificantes, a Equação 30.

$$I_s = \frac{\mu_{s_0} - \mu_s}{\mu_{s_0}} \cdot 100$$

Equação 29

sendo: I_s = inibição da atividade em % e μ_{s_0} = velocidade específica de consumo de substrato do controle (sem adição de cloro) em mg N-NO₃⁻.g SSV⁻¹.min⁻¹.

$$I_p = \frac{\mu_{p_0} - \mu_p}{\mu_{p_0}} \cdot 100$$

Equação 30

sendo: I_p = inibição da atividade em %; μ_{p_0} = velocidade específica de formação de produto do controle (sem adição de cloro) em $\text{mg N-NO}_x^- \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Nos ensaios de desnitrificação baseou-se na determinação do consumo de nitrato. Já na nitrificação optou-se por avaliar a inibição pela formação dos produtos (nitrito + nitrato), porque o uso do consumo do íon amônio poderia incorrer em erros, como o *stripping* do gás, bem como a reação incompleta com a formação do composto intermediário nitrito.

4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As determinações analíticas realizadas através da cromatografia iônica foram feitas nas amostras coletadas nos experimentos de toxicidade. Já, as amostras do monitoramento dos reatores de cultivo foram todas analisadas através de análises colorimétricas.

4.4.1 Análises por cromatografia iônica

4.4.1.1 Íons nitrato, nitrito e acetato

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo de íons marca DIONEX (Sunnyvale, Estados Unidos), modelo ICS 5000 EG, composto de um sistema capilar equipado com detector condutivimétrico, gerador de eluente KOH e supressora eletrolítica.

Para separação dos ânions utilizou-se coluna capilar IonPac AS18-Fast (0,4 x 150 mm) e pré-coluna IonPac AG18-Fast (0,4 x 35 mm), ambas da marca DIONEX. O volume de injeção foi de 0,4 μL e a vazão de eluente de 0,012 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Utilizou-se temperatura de 30 e 35 $^\circ\text{C}$ na coluna e detector, respectivamente. O gradiente de concentração de KOH no eluente foi o seguinte:

0 a 5 min – isocrático a 2,5 mM

5 a 16 min – gradiente de 2,5 a 50 mM

16 a 18 min –isocrático a 50 mM

As concentrações dos compostos foram determinadas a partir da curva padrão, onde se utilizou um padrão de 1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e procedeu-se a diluição conforme as concentrações estipuladas na curva analítica de

cada íon. Foram feitas diluições para serem usadas nas curvas analíticas dos íons nitrato, nitrito e acetato com valores de: 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 mg.L⁻¹.

4.4.2 Análises colorimétricas

4.4.2.1 Nitrato

Para a quantificação do nitrato foi utilizado o método do ácido salicílico sugerido por CATALDO et al. (1975). Neste método, primeiramente há formação de um complexo formado pelo íon nitrato e o ácido salicílico em condições altamente ácidas. Em seguida, a quantificação é realizada em meio básico pela a leitura da absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm. Utilizou-se um espectrofotômetro UV/VIS da marca HACH (Estados Unidos) e modelo DR 5000.

A concentração de N-NO_3^- é determinada então por regressão linear a partir de modelo obtido de uma curva padrão de nitrato de sódio.

4.4.2.2 Nitrito

Para a determinação do nitrito foi utilizado o kit analítico NitriVer 2 da marca HACH (Estados Unidos), método 8153. Neste método há redução do nitrito pelo sulfato ferroso em meio ácido produzindo óxido nitroso, os quais reagem com o cádmio dando origem a um cromógeno. Sua quantificação é dada pela leitura da absorbância no comprimento de onda de 585 nm.

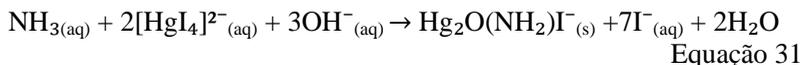
A concentração de N-NO_2^- é determinada a partir de uma curva padrão obtida através de soluções diluídas de nitrito de sódio. A faixa de abrangência do método é de 2 a 250 mg N-NO_2^- .L⁻¹.

4.4.2.3 Amônio

Para a determinação do nitrogênio amoniacal utilizou-se o método colorimétrico de Nessler, descrito por VOGEL (1981). Neste método, consistem em adicionar o reagente Nessler (uma solução alcalina de tetraiodomercurato (II) de potássio) na amostra a ser analisada. Caso a solução tenha amoníaco, forma-se um precipitado

amarelo-acastanhado. A cor será mais intensa quanto maior for a concentração de nitrogênio amoniacal.

A reação é descrita pela Equação 31.



Após o tempo reacional realiza-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm. A partir do valor da absorbância obtêm-se a concentração de N-NH_4^- por meio de uma curva padrão obtida a partir de soluções de cloreto de amônio. Foi utilizado para a leitura da absorbância um espectrofotômetro UV/VIS da marca HACH (Estados Unidos) e modelo DR 5000.

4.4.2.4 Demanda Química de Oxigênio

A análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi realizada segundo procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2005).

A metodologia consiste em adicionar à amostra uma solução de sulfato de prata ácida e uma solução digestora (composta por dicromato de potássio, sulfato de prata e ácido sulfúrico) e realizar a digestão por duas horas em refluxo fechado a 150°C. Após o tempo reacional é feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. A partir do valor da absorbância obtêm-se a concentração em mg de $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ através de uma curva padrão obtida por meio de soluções diluídas de biftalato de potássio. Foi utilizado para a leitura da absorbância um espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR5000.

4.4.2.5 Cloro livre

O cloro foi quantificado utilizando a metodologia DPD, através do kit composto por dois reagentes, iodeto de potássio e solução de DPD (N,N-dietil-p-fenilenediamina), adquirido pela empresa Alfakit. Este kit determina a quantidade de cloro livre na água, com a metodologia adaptada do *Standard Methods*, método 3500 B, 3-58 (APHA et al., 2005).

Neste método, o cloro livre reage com o reagente DPD desenvolvendo uma coloração rósea sendo quantificada no

comprimento de onda de 515 nm. Foi utilizado para a leitura um espectrofotômetro marca HACH e modelo DR5000.

A partir da absorbância, obtém-se a concentração de cloro livre em $\text{mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, determinada através de uma curva padrão. Esta curva é preparada a partir de amostras diluídas de permanganato de potássio. A faixa de detecção deste procedimento é de 0,1 a 3 $\text{mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

4.4.3 Sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV)

Os sólidos suspensos totais (SST) foram determinados de acordo com a metodologia descrita por ZDRADEK; SCHMIDELL; SOARES (2006) e ZDRADEK et al. (2008) na qual filtra-se a suspensão em membrana de acetato celulose com diâmetro de poros igual a 0,22 μm previamente seca em micro-ondas na potência de 180 W por 15 minutos e pesada em balança analítica. O papel filtro com a suspensão é mais uma vez submetido a secagem e em micro-ondas, nas mesmas condições de potência e tempo.

A concentração de SST é obtida a partir da diferença entre as massas secas das membranas antes e depois da filtração da amostra.

Os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foram determinados de acordo com o método descrito pelo *Standard Methods* (APHA et al., 2005). Foi realizado com as membranas previamente submetidas à análise de SST. Neste método a biomassa é calcinada a 600°C por 15 minutos. Os resultados foram obtidos em $\text{g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.4.4 pH

As medições de pH foram realizadas através de pHmetro da marca QUIMIS e calibrado segundo os procedimentos descritos pelo *Standard Methods* (APHA et al., 2005), com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO DE BACTÉRIAS

5.1.1 Bactérias desnitrificantes

A biomassa desnitrificante foi aclimatada e cultivada em laboratório durante 587 dias, sendo monitoradas as concentrações dos substratos neste período (Figura 10). A concentração de nitrato adicionado na entrada é representada pelo $(\text{N-NO}_3^-)_e$ e os produtos formados na saída (nitrito e nitrato) são representados por N-NO_2^- e N-NO_3^- , respectivamente. Quantificou-se também o carbono adicionado na entrada $(\text{DQO})_e$ e o carbono residual na saída DQO, representada pela análise de DQO.

Com esses dados pôde-se obter a eficiência na conversão do substrato a nitrogênio gasoso (Figura 11). Foi considerado que o consumo de nitrato e nitrito levaria a produção de nitrogênio gasoso, pois com as análises disponíveis não foi possível a medição dos produtos intermediários, bem como a quantificação da produção de nitrogênio gasoso.

Figura 10 – Monitoramento das formas nitrogenadas e DQO na saída do reator de cultivo de biomassa desnitrificante para utilização nos testes de toxicidade. Carga de alimentação em 3 etapas: 20,00, 42,92 e 85,84 mg N.L⁻¹.dia⁻¹.

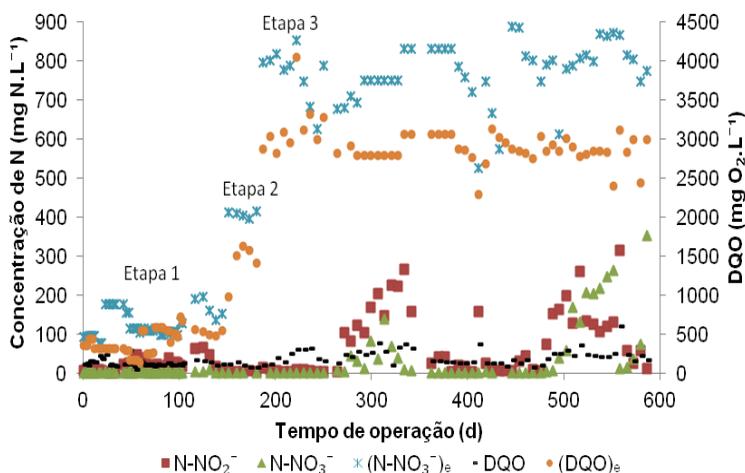
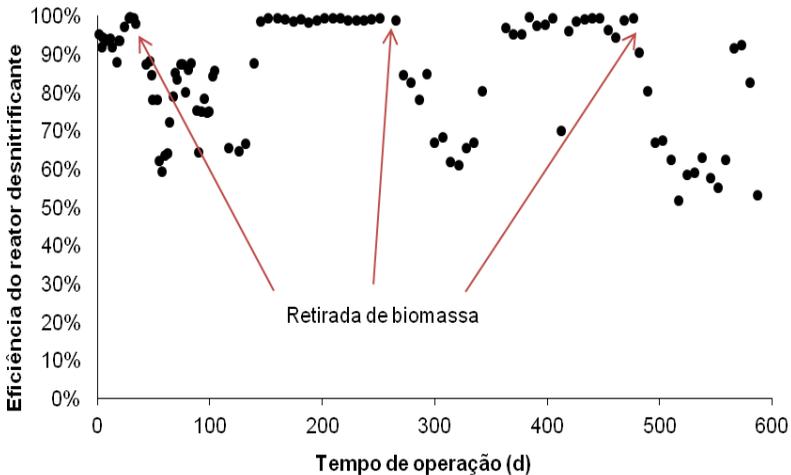


Figura 11 - Eficiência de conversão da desnitrificação ao longo do cultivo da biomassa para utilização nos experimentos de toxicidade.



A Etapa 1 de aclimação das bactérias com o meio sintético foi durante os primeiros 145 dias, apresentando baixas concentrações de nitrato e nitrato na saída do reator. A eficiência do reator caiu a 59,35% possivelmente devido ao acúmulo de nitrato formado, pois foi retirado biomassa para a realização de alguns ensaios nesse período.

Foi aumentado a carga do reator no 146º dia até o 181º dia (Etapa 2), chegando a eficiências de 99%. A partir do 182º dia, iniciou a Etapa 3 atingindo eficiências aproximadamente de 100%. Entretanto, observam-se dois picos descrentes no gráfico (Figura 11). Essa perda de eficiência ocorreu após a retirada da biomassa para realizar os testes de toxicidade, que em seguida houve um aumento na eficiência e sua estabilização.

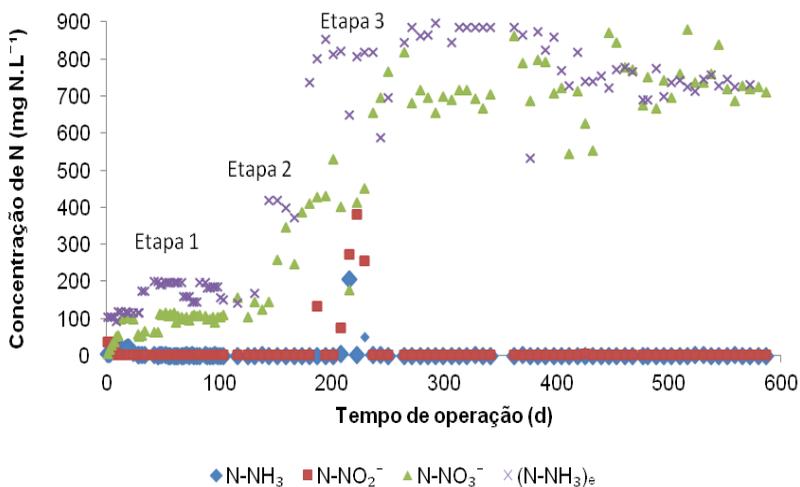
Durante praticamente todo o período de acompanhamento do reator foram mantidos níveis elevados de desnitrificação, muitas vezes chegando a 100%. A variação na eficiência do reator em relação à redução do nitrato não foi considerada uma característica negativa, uma vez que o objetivo do reator era a produção de células para os experimentos de toxicidade aguda sobre as bactérias desnitrificantes. Essas perdas de desempenho no reator em relação à desnitrificação foram ocasionadas pela retirada de células para os testes de toxicidade sendo mantida a mesma carga na alimentação.

O pH foi monitorado antes de retirar amostras para análise (Anexo 1, Figura 1). Durante o período de operação do reator, o pH apresentou-se elevado (aproximadamente 9,0) devido à formação de alcalinidade ocasionada pela reação de desnitrificação, sendo corrigido para 7,5, com solução de HCl a 10%, antes de uma nova alimentação.

5.1.2 Bactérias nitrificantes

A biomassa nitrificante foi aclimatada e cultivada em laboratório durante 587 dias, sendo monitorada a conversão dos substratos neste período (Figura 12). Com esses dados pode-se obter a eficiência na conversão de amônia a nitrato (Figura 13) durante o período de cultivo.

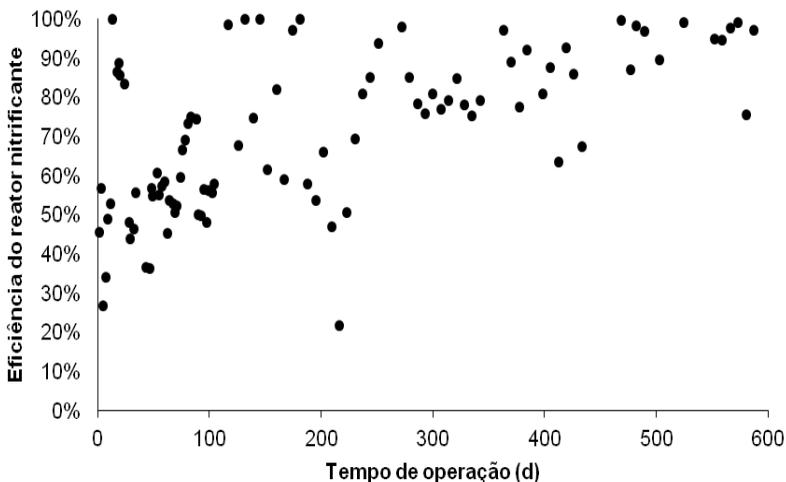
Figura 12 - Monitoramento das formas nitrogenadas do reator de cultivo de biomassa nitrificante para utilização nos testes de toxicidade. Carga de alimentação em 3 etapas: 20,00, 42,92 e 85,84 mg N.L⁻¹.dia⁻¹.



A Etapa 1 de aclimação das bactérias com o meio sintético foi durante os primeiros 145 dias. Neste período, o reator apresentou baixas concentrações de amônia e nitrito, mas não foi obtida a quantidade esperada para o nitrato, apresentando menor concentração do que foi adicionado. Isto pode ter acontecido por causa do *stripping* da amônia

devido ao pH elevado no reator durante este período (Anexo 1, Figura 2). A eficiência do reator ficou em torno de 50% nesta etapa.

Figura 13 - Eficiência de conversão da nitrificação ao longo do cultivo da biomassa para utilização nos experimentos de toxicidade.



Foi aumentada a carga do reator no 146º dia até o 181º dia (Etapa 2). Observou-se então uma oscilação e a eficiência chegou a 100%, neste curto período. A partir do 182º dia iniciou-se a Etapa 3, que resultou em um decaimento na eficiência do reator, se restabelecendo a partir do 237º dia, chegando a eficiências acima de 80%.

Pôde-se observar durante o período de acompanhamento do reator um crescimento na eficiência, muitas vezes chegando a níveis acima de 80%. A variação na eficiência do reator em relação à oxidação da amônia não foi considerada uma característica negativa, uma vez que o objetivo do reator era a produção de células para os experimentos de toxicidade aguda sobre as bactérias nitrificantes.

O pH foi medido nas amostras retiradas para análise (Anexo 1, Figura 2). Como na nitrificação há consumo de alcalinidade, o pH deveria diminuir, mas durante o período de operação do reator o pH das amostras apresentaram elevados (aproximadamente 9,0), provavelmente devido ao excesso de bicarbonado adicionado. O pH do reator foi corrigido para 7,5, com solução de HCl a 10%, antes de uma nova alimentação.

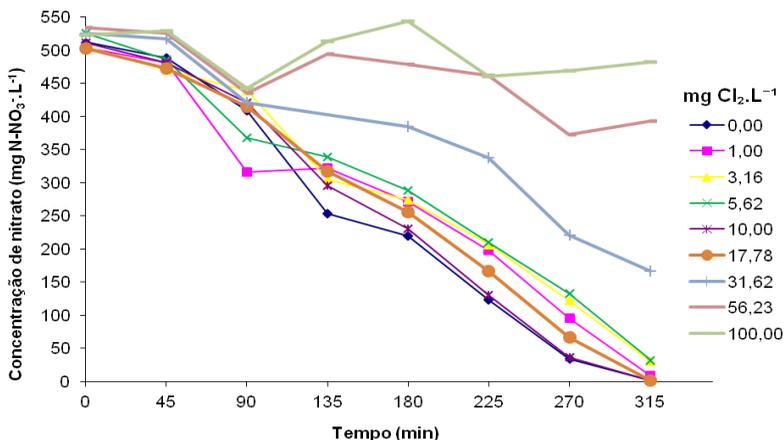
A aeração mantida dentro do reator foi suficiente para a realização da nitrificação e agitação do meio. Sua vazão não foi medida, mas a concentração de oxigênio dissolvido era aproximadamente de 7 mg O₂.L⁻¹.

5.2 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

5.2.1 Avaliação da toxicidade aguda sobre a desnitrificação

O ensaio cinético para estudo da toxicidade aguda do cloro sobre a desnitrificação foi conduzido por um período de 315 min. A Figura 14 apresenta os dados de consumo de nitrato durante o ensaio, sendo que cada linha representa um frasco, no qual foram adicionadas concentrações diferentes de cloro na etapa de contato com a biomassa. O pH inicial era de 7,3 e foi acompanhado durante o ensaio (Anexo 2 - Tabela 1 e Figura 4).

Figura 14 - Experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias desnitrificantes. Consumo de nitrato em função da concentração de cloro livre (mg Cl₂.L⁻¹) adicionada anteriormente à cinética sobre as bactérias desnitrificantes.

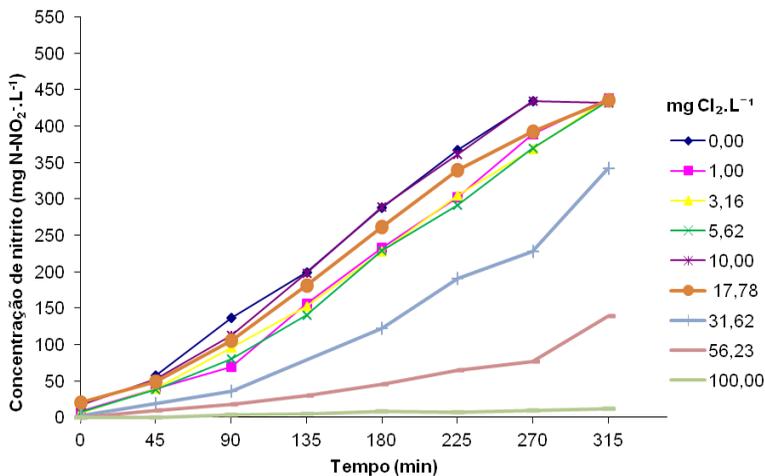


Pôde-se observar na Figura 14 que a partir da concentração de 31,63 mg Cl₂.L⁻¹ o consumo de nitrato apresenta uma evidente redução na velocidade. Isto pode significar visualmente um comportamento inibitório, comparando com o frasco onde não foi adicionado cloro. O

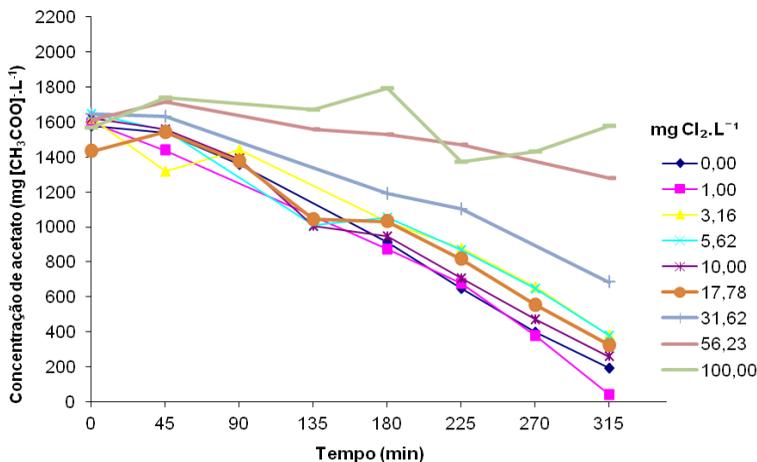
mesmo pode ser observado na Figura 15, na qual é apresentada a formação de nitrito (A) e o consumo de acetato (B) durante o ensaio de desnitrificação.

Figura 15 – Cinética de desnitrificação em função da concentração de cloro livre ($\text{mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) em experimento de toxicidade aguda. (A) Formação de nitrito. (B) Consumo de acetato.

A



B



Os experimentos foram acompanhados no tempo de 5,25 horas para se observar a primeira etapa de transformação (reação de NO_3^- a NO_2^-), isto é, a intenção não foi avaliar a conversão até nitrogênio gasoso porque isso dificultaria a avaliação da inibição.

Com os dados de coeficiente angular de cada reta formada, juntamente com os dados de concentração de biomassa remanescente em cada frasco, foram obtidos valores de velocidades consumo de nitrato para cada concentração de cloro livre adicionado (Tabela 9). Os valores de inibição em porcentagem também foram obtidos a partir destas velocidades com auxílio da Equação 29.

Tabela 9 - Velocidades de redução de nitrato e respectivas velocidades específicas nas diferentes concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias desnitrificantes.

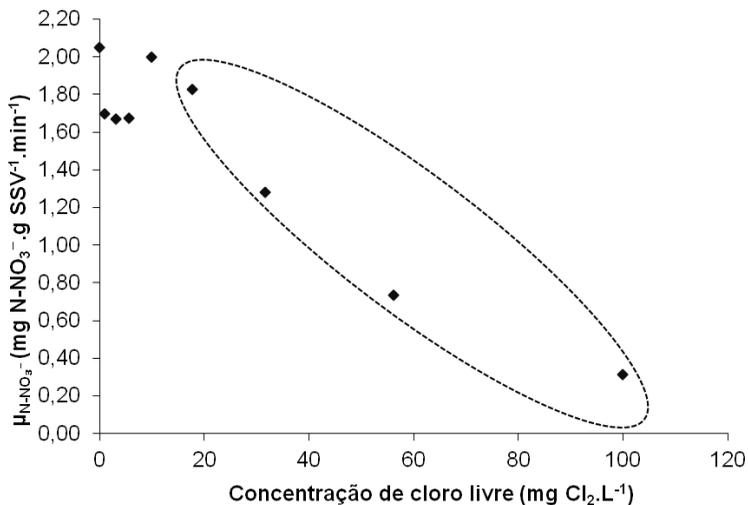
Concentração de cloro livre ($\text{mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	$-r_{\text{N-NO}_3^-}$ ($\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$\mu_{\text{N-NO}_3^-}$ ($\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	Inibição (NO_3^-) (%)
0,00	2,01	2,05	0,00
1,00	1,68	1,69	17,21
3,16	1,57	1,67	18,45
5,62	1,45	1,67	18,37
10,00	1,96	2,00	2,53
17,78	1,80	1,83	10,70
31,62	1,18	1,28	37,51
56,23	0,68	0,74	64,07
100,00	0,31	0,31	84,69

As velocidades específicas de consumo do substrato N-NO_3^- obtidas em cada frasco apresentaram uma variação decrescente. Duas possibilidades pra explicar esse comportamento: alteração na atividade das bactérias que permaneceram vivas e/ou modificação na fração de células vivas e mortas.

Pode-se observar (Figura 16) que as velocidades específicas nos frascos em que continham cloro livre de 1,00, 3,16 e 5,62 mg Cl_2^{-1} tiveram um comportamento em que não seguiu a curva desejada. Isso pode ter ocorrido devido à dificuldade analítica, pois os μ_s não são de fácil determinação. Porém, para os cálculos de IC50 não foi necessário

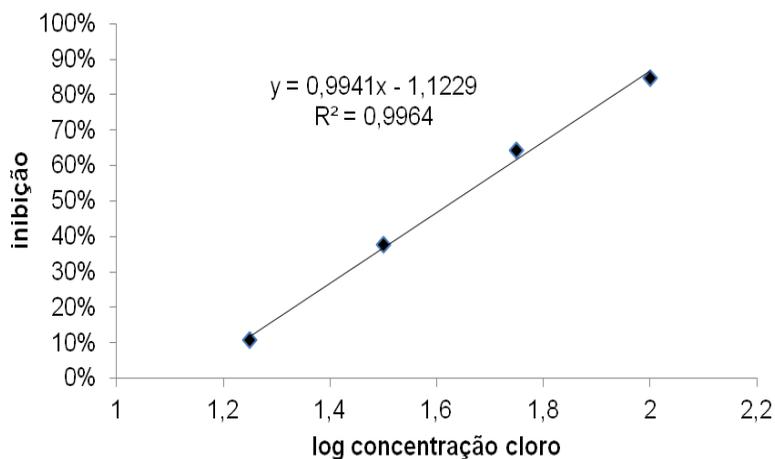
utilizar estes dados, já que a obtenção destes valores se dá na faixa de inibição, que neste caso inicia claramente a partir de 31,62 mg Cl₂.L⁻¹.

Figura 16 - Velocidades específicas de redução do nitrato em função das concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias desnitrificantes



Foi possível determinar a IC₅₀ a partir da correlação entre o grau de inibição na desnitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre (Figura 17). Foi utilizada para traçar o gráfico a faixa de inibição do cloro entre 17,78 e 100 mg Cl₂.L⁻¹, onde se obteve a equação $y=0,9941.x - 1,1229$ ($R^2=0,9964$). O valor encontrado da IC₅₀ foi de 42,91 mg Cl₂.L⁻¹ para as condições testadas.

Figura 17 - Correlação entre o grau de inibição na desnitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre.



Outro caso que pode ser discutido neste ensaio de toxicidade é a relação de cloro e a quantidade de biomassa adicionada. Na oxidação completa da matéria orgânica pelo cloro o carbono da biomassa oxida doando 4 elétrons e o cloro se reduz recebendo 2 elétrons, como pode-se observar no esquema abaixo. Portanto, considerando que 1 mol de biomassa apresenta 5 carbonos, são necessários 10 moles de cloro para oxidação completa de 1 mol de biomassa (OCI⁻/SSV molar igual a 10:1). Na Figura 18 podem ser observadas as relações molares de cloro e biomassa em que foi inserido em cada frasco nos ensaios de toxicidade.

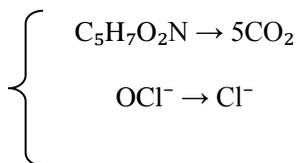
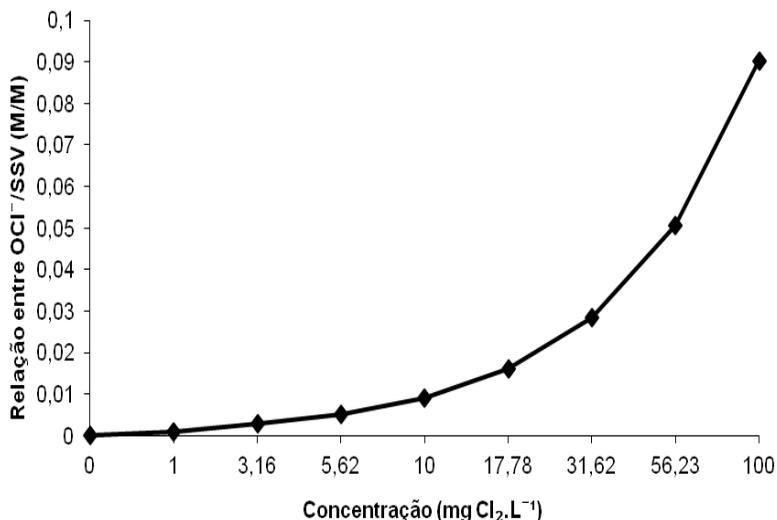


Figura 18 – Relação molar de cloro livre adicionado em bactérias desnitrificantes e sólidos suspensos voláteis inicial, na etapa de contato.



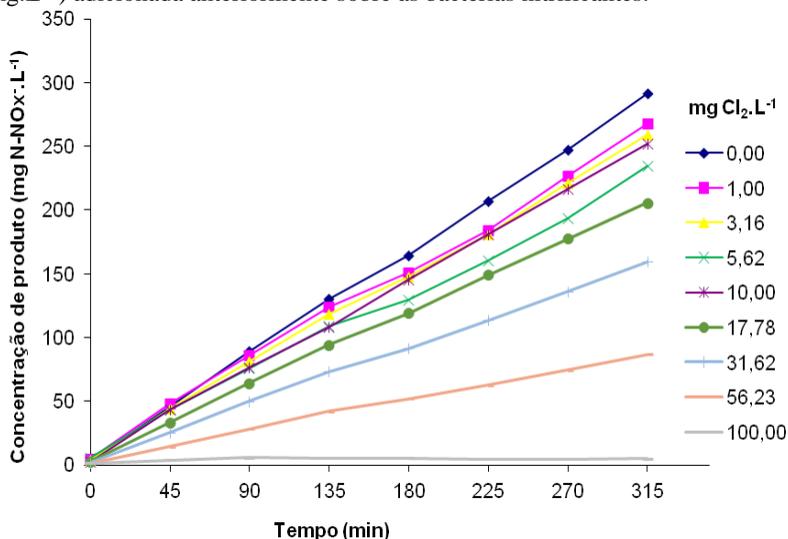
Pode-se observar que, mesmo para uma relação molar OCI^- /SSV de 0,09 (frasco contendo $100 mg Cl_2.L^{-1}$), bem abaixo da relação molar necessária para oxidação completa da biomassa (10:1), já se observou uma inibição quase total da atividade microbiana. Isto se explica facilmente se considerar que apenas uma oxidação parcial já é suficiente para que uma biomolécula perca a sua funcionalidade, portanto, a destruição/inativação de uma pequena parcela das macromoléculas já é suficiente para inativar completamente a célula.

Outro ponto de vista observado foi o efeito do cloro sobre a composição da biomassa. Após o contato do cloro com a biomassa desnitrificante, as relações mássicas entre os SSV e SST em todos os frascos permaneceram constantes em 0,72, isto é, não houve alteração nesta relação ao adicionar concentração maior de cloro livre. Isso pode evidenciar que a biomassa inativa oxidada pelo cloro pode também estar sendo quantificada na determinação dos sólidos voláteis após a exposição ao cloro, de modo que não é possível afirmar se os valores mais reduzidos de atividade específica onde se observou inibição representam uma queda na atividade das células remanescentes ou apenas uma subestimação dos valores devido à presença de uma parcela de células inativadas nos sólidos suspensos.

5.2.2 Avaliação da toxicidade aguda sobre a nitrificação

No experimento de toxicidade aguda sobre a nitrificação, o consumo de amônia foi acompanhado de forma indireta pela formação dos produtos (somatório de nitrito e nitrato – $N-NO_x^-$) (Figura 19). O pH inicial era de 7,4 e foi acompanhado durante o ensaio (Anexo 3 - Tabela 2 e Figura 5).

Figura 19 - Experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias nitrificantes. Formação de NO_x^- em função da concentração de cloro livre ($mg.L^{-1}$) adicionada anteriormente sobre as bactérias nitrificantes.



Pode-se observar a diminuição da velocidade de formação dos produtos com o aumento na concentração de cloro livre na etapa de contato, chegando à inibição completa com 100 $mg Cl_2.L^{-1}$.

Com os dados de velocidade de oxidação da amônia (formação de NO_x^-), juntamente com os dados de concentração de biomassa remanescente em cada frasco (concentração celular após a etapa de contato com o cloro), foram obtidos valores de velocidade específica de formação de $N-NO_x^-$ para cada concentração de cloro livre testada e os respectivos percentuais de inibição (Tabela 10).

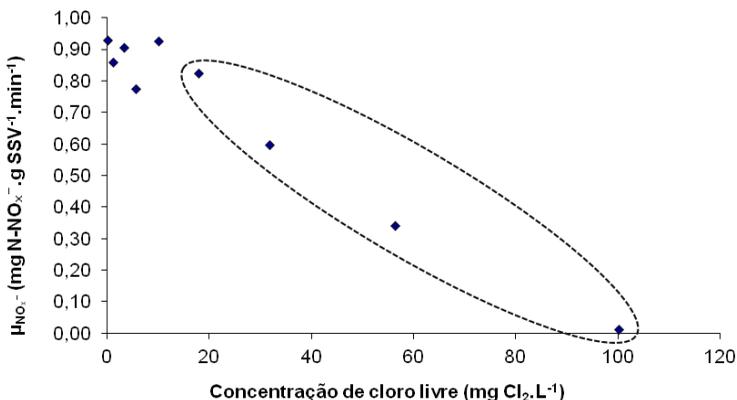
Tabela 10 - Velocidades de formação de N-NO_x⁻ e respectivas velocidades específicas nas diferentes concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias nitrificantes.

Concentração de cloro livre (mg Cl ₂ .L ⁻¹)	r _{NO_x⁻} (mg N-NO _x ⁻ .L ⁻¹ . min ⁻¹)	μ _{NO_x⁻} (mg N-NO _x ⁻ .gSSV ⁻¹ . min ⁻¹)	Inibição (%)
0,00	0,88	0,93	0,00
1,00	0,77	0,86	7,69
3,16	0,77	0,91	2,65
5,62	0,65	0,78	16,61
10,00	0,77	0,93	0,47
17,78	0,64	0,83	11,33
31,62	0,48	0,60	35,86
56,23	0,26	0,34	63,20
100,00	0,01	0,01	98,70

Os valores de velocidade específica obtidos ao longo do experimento também apresentaram uma variação como foi observado no experimento de toxicidade sobre as bactérias desnitrificantes. Este assunto foi discutido no item 5.2.1.

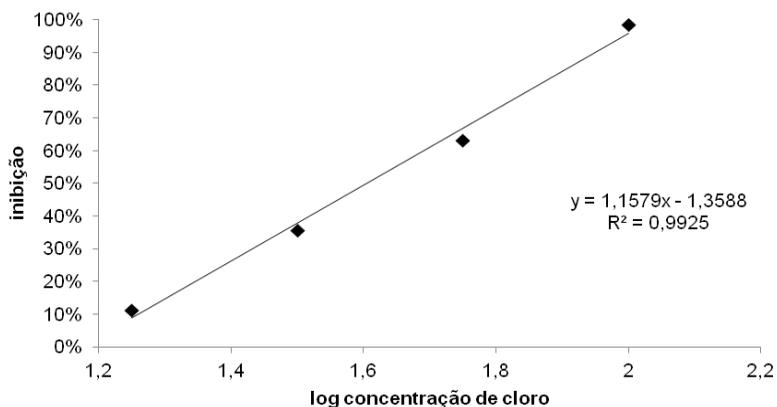
Pode-se observar (Figura 20) que as velocidades específicas nos frascos em que foram adicionados cloro livre de 1,00, 3,16 e 5,62 mg Cl₂.⁻¹ também obtiveram dados em que não seguiram o comportamento da curva desejada, como aconteceu no experimento utilizando a biomassa desnitrificante. Como mencionado anteriormente, pode ter sido devido à dificuldade analítica, pois os μ_{NO_x⁻} não são de fácil determinação. Porém, para os cálculos de IC50 não foi necessário utilizar estes dados.

Figura 20 - Velocidades específicas de formação de N-NO_x^- versus concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias nitrificantes.



Foi possível determinar a IC50 a partir da correlação entre o grau de inibição na nitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre (Figura 21). Foi utilizada para traçar o gráfico a faixa de inibição do cloro entre 17,78 e 100 mg Cl₂.L⁻¹, onde se obteve a equação $y = 1,1579x - 1,3588$ ($R^2 = 0,9925$). O valor encontrado da IC50 foi de 40,30 mg Cl₂.L⁻¹ para as condições testadas.

Figura 21 – Correlação entre o grau de inibição na nitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre.

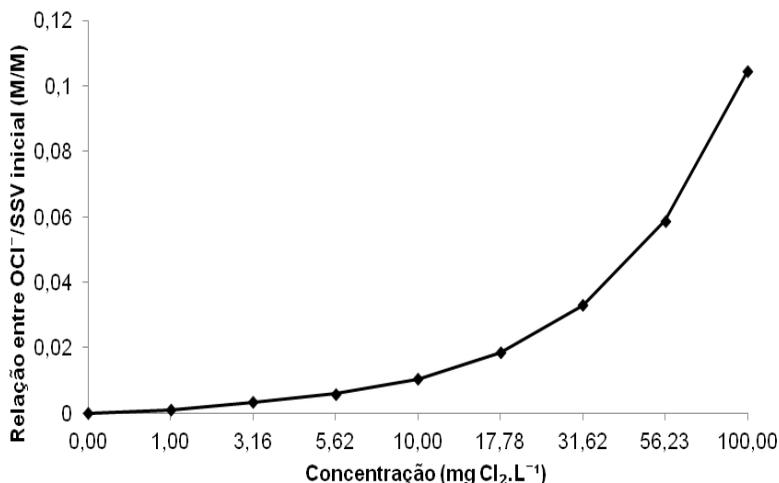


Os resultados dos experimentos realizados referentes à IC50 nos processos de desnitrificação e nitrificação mostraram-se semelhantes,

isto é, os efeitos tóxicos do cloro tem o mesmo comportamento quando colocado em contato com biomassa em ambos os processos. Para a maioria dos agentes xenobióticos, contudo, observa-se que as bactérias nitrificantes apresentam maior sensibilidade do que as bactérias desnitrificantes (DALHAMMAR; GRUNDITZM, 2001).

Como já foi discutido no item 5.2.1 sobre a estequiometria da oxidação completa da matéria orgânica pelo cloro, pode-se também observar as relações molares de cloro e biomassa nitrificante adicionadas nos frascos nos ensaios de toxicidade na Figura 22.

Figura 22 - Relação molar de cloro livre adicionado em bactérias nitrificantes e sólidos suspensos voláteis inicial, na etapa de contato.



Para uma relação molar OCl^- /SSV de 0,10 (frasco contendo 100 $mg Cl_2.L^{-1}$), bem abaixo da relação molar necessária para oxidação completa da biomassa (10:1), também foi observado uma inibição praticamente total da atividade microbiana nitrificante. Isto se explica facilmente se considerar que apenas uma oxidação parcial já é suficiente para que uma biomolécula perca a sua funcionalidade, portanto, a destruição/inativação de uma pequena parcela das macromoléculas já é suficiente para inativar completamente a célula.

Assim como no experimento realizado para avaliar a toxicidade sobre a desnitrificação, a relação mássica entre os SSV e SST em todos os frascos permaneceram constantes, em 0,77, isto é, não houve alteração nesta relação ao adicionar concentração maior de cloro livre.

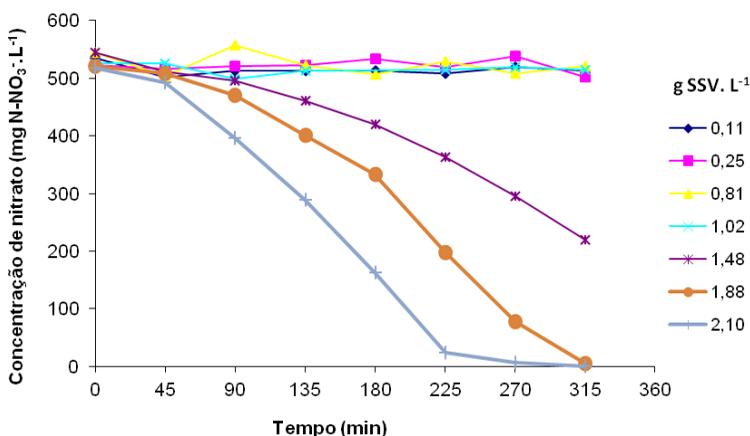
As implicações disto na interpretação dos resultados já foram discutidas no item anterior (item 5.2.1).

5.2.3 Avaliação da influência da concentração celular sobre a toxicidade do cloro

As quantidades adicionadas de cloro livre nos experimentos anteriores não foram suficientes para oxidar completamente a biomassa, mas observar o efeito causado em uma concentração celular fixa. Entretanto, o objetivo deste item era observar o efeito do comportamento da IC50 em diversas concentrações celulares.

Os resultados de consumo de nitrato obtidos no ensaio realizado para verificação da influência da concentração celular sobre a magnitude dos efeitos inibitórios do cloro estão apresentados na Figura 23. O ensaio teve duração total de 5 h e 15 min onde foram testadas diferentes concentrações celulares na etapa de contato com o cloro, sempre na presença de $42,6 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ (IC50 obtida no item 5.2.1). Os pontos representam os valores médios das análises feitas em duplicata. O pH inicial era de aproximadamente 7,3 e foi acompanhado durante o ensaio (Anexo 4 - Tabela 3 e Figura 6).

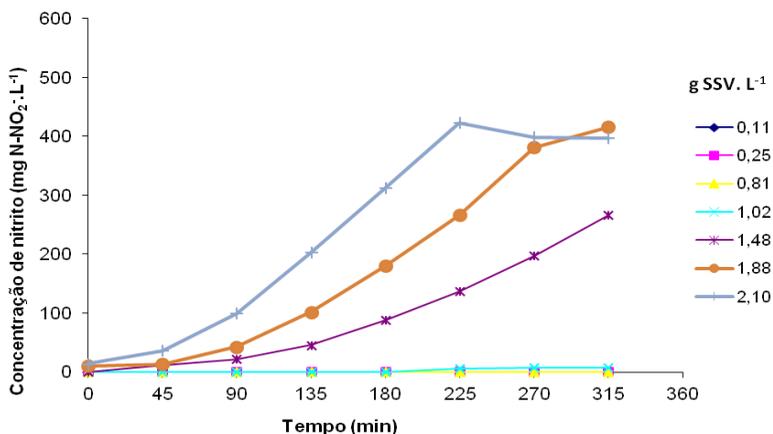
Figura 23 - Experimento de toxicidade aguda realizado com variação da concentração de bactérias desnitrificantes. Consumo de nitrato ao longo do tempo em função da concentração de SSV ($\text{g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) após a etapa de contato com a biomassa e o cloro a $42,6 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.



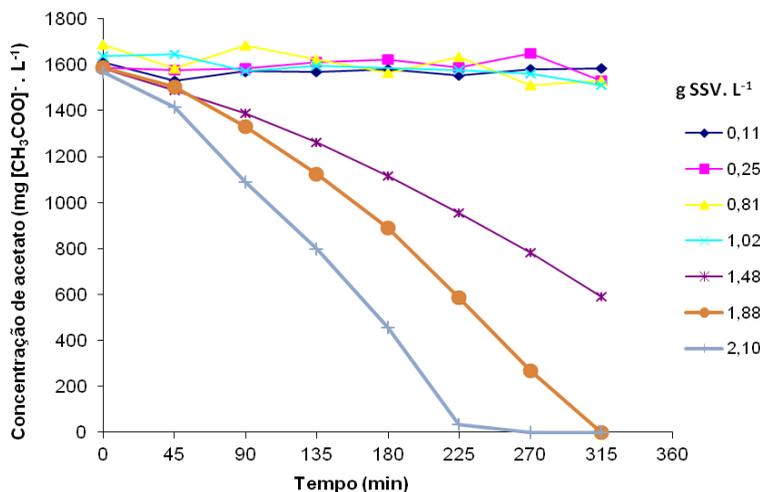
Pode-se observar que apenas nos frascos contendo 1,48, 1,88 e 2,10 g SSV.L⁻¹ houve consumo de nitrato, enquanto que nos demais frascos a inibição foi total e não houve degradação do substrato. Estes resultados são corroborados pelos perfis de formação de nitrito (A) e consumo de acetato (B) durante a cinética de desnitrificação Figura 24 – A e B, respectivamente).

Figura 24 - Cinética de desnitrificação em função da concentração de SSV (mg SSV.L⁻¹) em experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias desnitrificantes, após a etapa de contato com a biomassa e o cloro a 42,6 mg Cl₂.L⁻¹. (A) Formação de nitrito. (B) Consumo de acetato.

A



B



Com os dados de velocidade de consumo de nitrato, juntamente com os dados de concentração de biomassa remanescente em cada

frasco, foram obtidos valores de velocidade específica de consumo de nitrato para cada concentração de biomassa testada (Tabela 11).

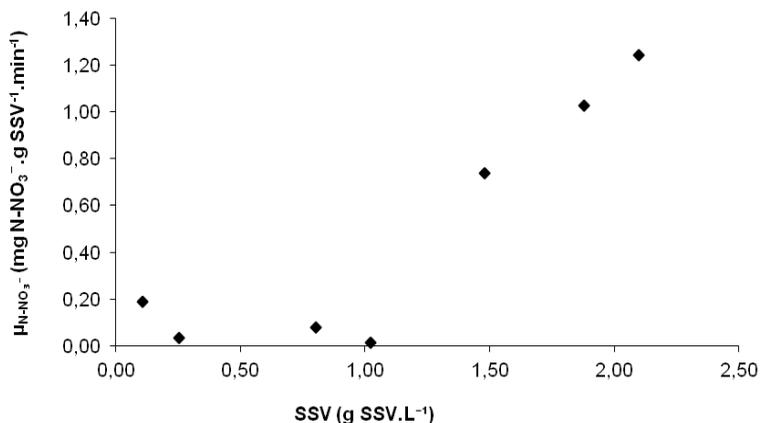
A concentração de SSV foi determinada no início do experimento no momento em que foram inseridos os substratos e iniciado o ensaio cinético de conversão sobre a biomassa desnitrificante.

Tabela 11 - Velocidades de consumo de nitrato e respectivas velocidades específicas de consumo de nitrato nas diferentes concentrações de SSV, após o contato com cloro livre a 42,60 mg Cl₂.L⁻¹.

Concentração SSV (g SSV.L ⁻¹)	$-r_{N-NO_3^-}$ (mg N-NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ .min ⁻¹)	$-\mu_{N-NO_3^-}$ (mg N-NO ₃ ⁻ .g SSV ⁻¹ .min ⁻¹)
0,11 (±0,06)	0,02	0,19
0,25 (±0,04)	0,01	0,03
0,81 (±0,02)	0,06	0,08
1,02 (±0,04)	0,01	0,01
1,48 (±0,08)	1,09	0,74
1,88 (±0,11)	1,93	1,03
2,10 (±0,04)	2,61	1,24

As velocidades específicas foram determinadas com os pontos em que o consumo de nitrato era linear. O comportamento das velocidades específicas em relação às concentrações de SSV se encontram na Figura 25, onde pode-se observar que nos frascos com até 1,02 g SSV.L⁻¹ houve inibição completa. Nos demais frascos, as velocidades específicas apresentaram um comportamento linear crescente.

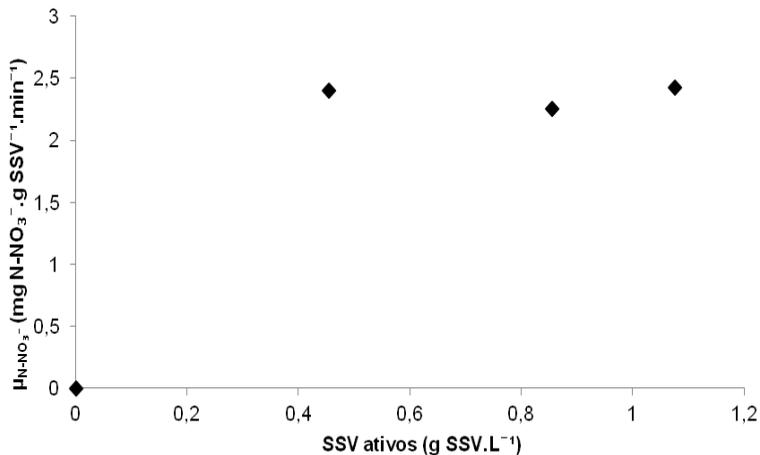
Figura 25 - Velocidades específicas de redução do nitrato versus concentração de biomassa desnitrificante, após o contato com cloro livre à concentração final nos frascos de $42,60 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ em ensaio de toxicidade aguda.



Conforme já discutido anteriormente (item 5.2.1), a biomassa determinada pelas análises de SSV poderia estar ativa ou não. Entretanto, considerando a hipótese de que o cloro provavelmente não destruiu as células inativadas, isto é, não converteu tudo a dióxido de carbono, optou-se em desconsiderar a biomassa que estava desativada para o cálculo das velocidades específicas.

Como os frascos com até $1,02 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ não obtiveram conversões, foi descontado esta massa do valor dos sólidos mensurados nos frascos em que tinha concentração maior de células. Assim, foram recalculadas as velocidades específicas com estes novos valores de biomassa (Figura 26).

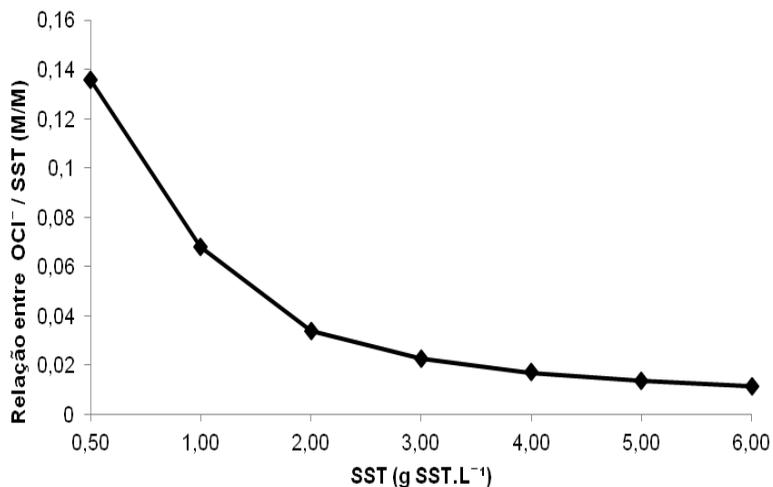
Figura 26 - Velocidades específicas de redução do nitrato em função da variação da concentração de SSV ativos.



Após este procedimento, pôde-se observar que as velocidades específicas permaneceram constantes para as concentrações que não apresentaram inibição completa, o que aponta para a possibilidade de que o cloro inative uma quantidade de biomassa fixa, e não um percentual da atividade da biomassa como é pressuposto no conceito de IC50.

Pode ser visto na Figura 27 relações molares menores que a estequiométrica (<10:1).

Figura 27 – Relação molar de cloro livre e SST. Concentração fixa de cloro livre de $42,60 \text{ mg.L}^{-1}$ dentro dos frascos e concentração de sólidos antes do contato com o cloro (g SST.L⁻¹), com volume total nos frascos de 250mL.



Pôde-se verificar que nos frascos contendo a menor concentração de biomassa ($0,5 \text{ g SST.L}^{-1}$) a relação molar OCl⁻/SST (0,14:1) foi abaixo da relação molar necessária para oxidação completa da biomassa (10:1). Entretanto, não houve consumo de substrato. Já nos frascos em que continham uma relação molar OCl⁻/SST abaixo de 0,017, foi observado consumo de substrato. Isto mostra que havia quantidade de células suficiente para sofrer os efeitos inibitórios do cloro e ainda ter células ativas para estabelecer o processo de desnitrificação.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo pôde-se avaliar o efeito do cloro, após o contato com a biomassa, na desnitrificação e na nitrificação, através de testes de toxicidade aguda.

É possível estabelecer a desnitrificação e nitrificação após o contato do cloro livre sobre as bactérias. Entretanto, isto depende de uma relação entre a concentração celular e a concentração de cloro livre presente.

Os testes de toxicidade aguda evidenciaram a sensibilidade ao cloro em bactérias desnitrificantes e nitrificantes. Com os experimentos realizados foi possível identificar as IC₅₀ de 42,9 e 40,3 mg Cl₂.L⁻¹, em concentrações celulares iniciais de 1,77 g SSV.L⁻¹ e 1,53 g SSV.L⁻¹ e pH de 7,3 e 7,4, para a desnitrificação e nitrificação, respectivamente.

Contudo, a exposição de diferentes concentrações celulares a uma mesma concentrações de cloro (IC₅₀ verificada nos experimentos anteriores) evidenciou que o cloro inativa uma quantidade de biomassa fixa, e não um percentual como é pressuposto no conceito de IC₅₀. Portanto, a magnitude dos efeitos tóxicos do cloro sobre uma dada população microbiana está mais relacionada à relação entre as concentrações de cloro e biomassa do que à concentração do cloro isoladamente.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar a toxicidade do cloro em diferentes pH sobre as bactérias desnitrificantes e nitrificantes;
- Análises da composição genérica e da estrutura da biomassa após o contato do cloro livre com a técnica de FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*) para visualizar os efeitos intracelulares causados na células.
- Testar a toxicidade de cloraminas sobre as bactérias nitrificantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONISEN, A. C. et al. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal WPCF**, v. 48, n. 5, p. 835-852, 1976.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**. 21. Washington: American Public Health Association, 2005.

AZEVEDO NETTO, J. M. **Técnica de abastecimento e tratamento de água**. 2 ed. rev. São Paulo: Cetesb, Ascetesb, 1976.

BERG, J. D.; ROBERTS, P. V.; MATIN, A. Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of Escherichia coli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 60, n. 3, p. 213-220, 1986.

BITTON, G. **Wastewater Microbiology**. 3ª ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 2005.

BLASER, M. J. et al. Inactivation of Campylobacter by chlorine and monochloramine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 307-311, 1986.

BRESSAN, C. R. **Toxicidade do antibiótico sulfato de colistina empregado na suinocultura sobre processo microbiológicos relacionados ao tratamento de efluentes**. 2012. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos., Universidade Federal de Santa Catarina.

CAMPOS, J. L. et al. Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 141-148, 1999.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CERVANTES, F. J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution**. London: IWA Publishing, 2009.

CETESB. Cloro. **FIT - Ficha de Informação Toxicológica**, 2012. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/cloro.pdf> Acesso em: 18/02/2014.

CHERNICHARO, C. A. L. et al. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por sistemas de desinfecção. In: CHERNICHARO, C. A. L. (Ed.). **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: Segrac, 2001. cap. 7, p.66.

DALHAMMAR, G.; GRUNDITZM, C. DEVELOPMENT OF NITRIFICATION INHIBITION ASSAYS USING PURE CULTURES OF NITROSOMONAS AND NITROBACTER. **Wat. Res.**, v. 35, n. 2, p. 433-440, 2001.

ETCHEBEHERE, C. Microbiologia, Ecologia y Bioquímica. In: SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M., *et al* (Ed.). **Tratamento biológico de águas residuárias**. 1 ed. Florianópolis, 2007. cap. VI, p.p. 433 - 447.

GERARDI, M. H. **Wastewater Bacteria**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

GUTZ, I. G. R. **Software CurTiPot - pH e Curvas de Titulação Potenciométrica: Análise e Simulação**. 3.6.1, V. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html> 2012.

HAAS, C. N.; ENGELBRECHT, R. S. Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from chlorination. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 52, n. 7, p. 1976-1989, 1980.

HOOVER, S. R.; PORGES, N. Assimilation of diary wastes by activated sludge-II. The equations of synthesis and rate of oxygen utilisation. **Sewage Ind Waste**, v. 24, p. 306-312, 1952.

KULIKOVSKY, A.; PANKRATZ, H. S.; SADOFF, H. L. Ultrastructural and Chemical Changes in Spores of *Bacillus cereus* after Action of Disinfectants. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 38, n. 1, p. 39-46, 1975.

LEYER, G. J.; JOHNSON, E. A. Acid adaptation sensitizes *Salmonella typhimurium* to hypochlorous acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 461–467, 1997.

LIBRARY OF MEDICINE, E. N. Chlorine. **National Institutes of Health, Department of Health & Human Services**, Bethesda, 2014. Disponível em: < <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/7782-50-5#structure> >. Acesso em: 12/02/2014.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8ª Edição. N.Y.: Prentice Hall, 1997.

MATEJU, V. et al. Biological water denitrification - A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, p. 170 -183, 1992.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, p. 99-110, 1994.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. E. Blucher, 1972.

PAINTER, H. A. A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. **Water Research**, v. 4, n. 6, p. 393–450, 1970.

SCHMIDELL, W.; REGINATTO, V. Processos de Eliminação de Nitrogênio. In: SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M., *et al* (Ed.). **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. 1 ed. Florianópolis: Gráfica Paperprint, 2007. cap. VI.2, p.449-508.

USEPA; et al. DRINKING WATER CRITERIA DOCUMENT FOR CHLORAMINES. **HEALTH AND ECOLOGICAL CRITERIA DIVISION. OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY. OFFICE OF WATER**, 1994. Disponível em: < <http://www.epa.gov/ncea/pdfs/water/chloramine/dwchloramine.pdf> >.

VAN HAANDEL, A.; KATO, M.; VON SPERLING, M. Remoção biológica de Nitrogênio: Aplicações para o Sistema de Lodo Ativado.

In: MOTA, S. B. e VON SPERLING, M. (Ed.). **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. 1ª edição. Rio de Janeiro: PROSAB, 2009. cap. 6, p.174-226.

VENKOBACHAR, C., Z.; IYENGAR, L.; PRABHAKARA RAO, A. V. S. Mechanism of disinfection: Effect of chlorine on cell membrane functions. **Water Research**, v. 11, n. 8, p. 727-729, 1977.

VISHNIAC, W.; SANTER, M. The *thiobacilli*. **Bacteriology Review**, v. 21, n. 3, p. 195-213, 1957.

VOGEL, A. I. **Análise Inorgânica Quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981.

WIESMANN, U. Biological Nitrogen Removal from Wastewater. In: FLETCHER, A. (Ed.). **Advances in Biochemical Engineering**. Alemanha: Springer-Verlag, v.51, 1994. p.113-154.

ZDRADEK, C. P.; SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M. **Determinação da concentração de sólidos totais: comparação entre os resultados obtidos em estufa convencional e em forno microondas**. . XI MET - Encontro Nacional de Metodologias de Laboratório, SCBrasil. : 36 p. 2006.

ZDRADEK, C. P. et al. **Metodologia para determinação de sólidos suspensos totais (SST), para sistemas de tratamento biológico de águas residuárias, utilizando microondas**. 48º Congresso Brasileiro de Química - Química na proteção ao meio ambiente e à saúde. Rio de Janeiro 2008.

ANEXOS

ANEXO 1

Dados referentes ao cultivo das bactérias

Figura 1 - Monitoramento da temperatura e do pH no cultivo das bactérias desnitrificantes.

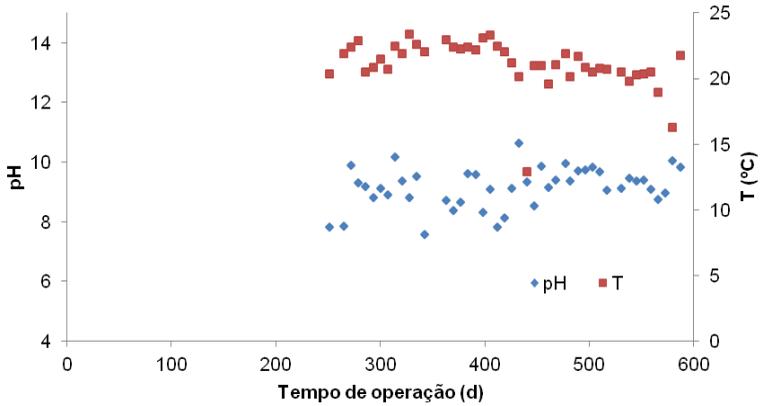
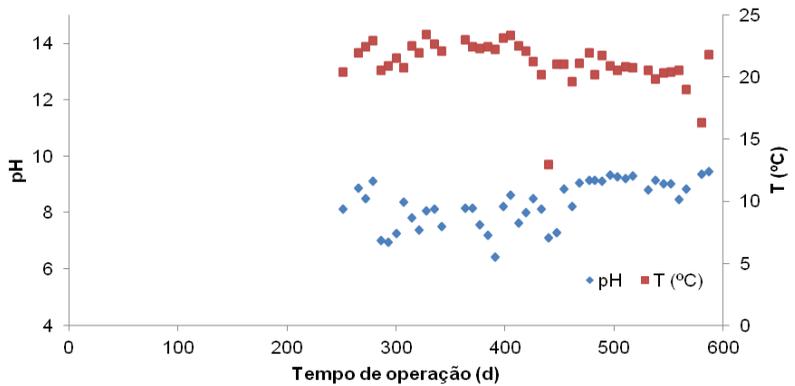


Figura 2 - Monitoramento da temperatura e do pH no cultivo das bactérias nitrificantes.



ANEXO 2

Dados referentes às cinéticas de desnitrificação

Figura 3 - Experimento preliminar para determinação da faixa de concentração de cloro para os ensaios de toxicidade aguda. Cinética de desnitrificação utilizando concentrações de cloro livre de 0 a 803,1 mg Cl₂.L⁻¹, com pH inicial igual a 7,3. Tempo de contato entre o cloro e biomassa de 20 minutos, realizado antes da cinética.

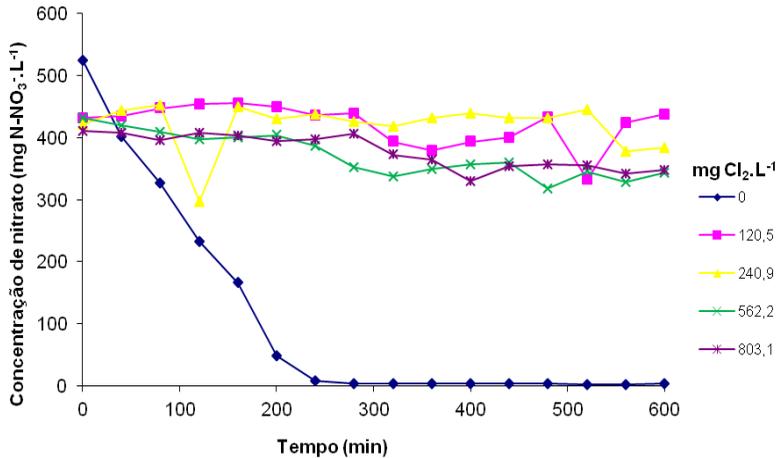
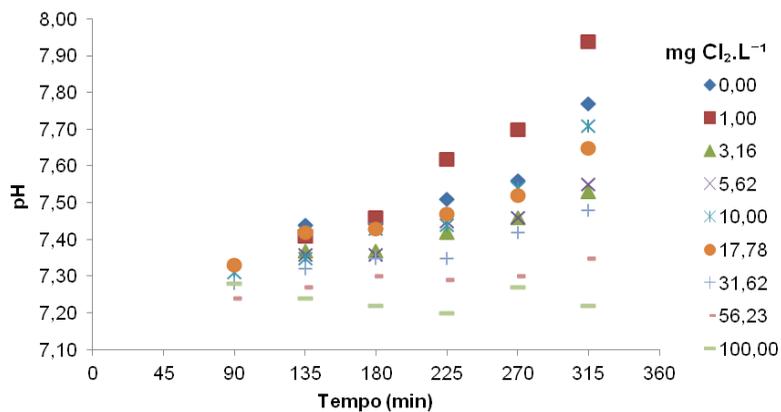


Tabela 1 - Dados do acompanhamento do pH no experimento de toxicidade sobre as bactérias desnitrificantes.

pH	Concentração de cloro livre (mg Cl ₂ .L ⁻¹)									
	t (min)	0,00	1,00	3,16	5,62	10,00	17,78	31,62	56,23	100,00
90						7,31	7,33	7,28	7,24	7,28
135	7,44	7,41	7,37	7,36	7,35	7,42	7,32	7,27	7,24	
180	7,43	7,46	7,37	7,36	7,43	7,43	7,35	7,30	7,22	
225	7,51	7,62	7,42	7,45	7,44	7,47	7,35	7,29	7,20	
270	7,56	7,70	7,46	7,46	7,54	7,52	7,42	7,30	7,27	
315	7,77	7,94	7,53	7,55	7,71	7,65	7,48	7,35	7,22	

Figura 4 – Acompanhamento do pH em função da concentração de cloro livre ($\text{mg Cl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) adicionada anteriormente sobre as bactérias desnitrificantes.



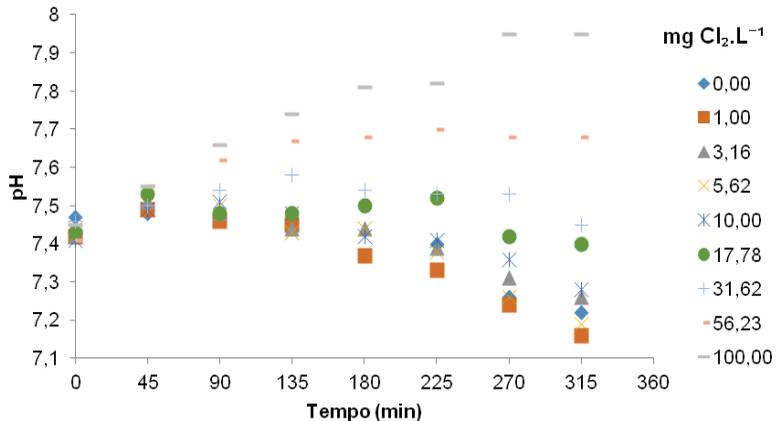
ANEXO 3

Dados referentes à cinética de nitrificação

Tabela 2 - Dados do acompanhamento do pH no experimento de toxicidade sobre as bactérias nitrificantes.

pH	Concentração de cloro livre ($\text{mgCl}_2\cdot\text{L}^{-1}$)								
t (min)	0,00	1,00	3,16	5,62	10,00	17,78	31,62	56,23	100,00
0	7,47	7,42	7,42	7,44	7,41	7,43	7,46	7,41	7,45
45	7,48	7,49	7,51	7,52	7,49	7,53	7,5	7,55	7,55
90	7,47	7,46	7,48	7,5	7,51	7,48	7,54	7,62	7,66
135	7,44	7,45	7,44	7,43	7,48	7,48	7,58	7,67	7,74
180	7,37	7,37	7,44	7,44	7,42	7,5	7,54	7,68	7,81
225	7,4	7,33	7,39	7,38	7,41	7,52	7,53	7,7	7,82
270	7,26	7,24	7,31	7,26	7,36	7,42	7,53	7,68	7,95
315	7,22	7,16	7,26	7,19	7,28	7,4	7,45	7,68	7,95

Figura 5 - Acompanhamento do pH em função da concentração de cloro livre ($\text{mg Cl}_2\cdot\text{L}^{-1}$) adicionada anteriormente sobre as bactérias nitrificantes.



ANEXO 4

Dados referentes à cinética de variação de biomassa.

Tabela 3 - Dados do acompanhamento do pH no experimento de toxicidade variando a concentração de biomassa

	Concentração de biomassa (g SST.L ⁻¹)						
t (min)	0,44	0,60	1,21	1,44	1,98	2,66	3,08
0	7,22	7,25	7,26	7,27	7,29	7,32	7,39
45	7,27	7,23	7,25	7,25	7,32	7,36	7,47
90	7,27	7,26	7,27	7,28	7,39	7,45	7,60
135	7,28	7,27	7,26	7,27	7,45	7,53	7,70
180	7,27	7,33	7,24	7,25	7,43	7,62	7,86
225	7,25	7,25	7,23	7,22	7,53	7,76	8,04
270	7,25	7,26	7,25	7,27	7,61	7,87	8,05
315	7,24	7,27	7,24	7,26	7,68	8,05	8,08

Figura 6 – Acompanhamento do pH ao longo do tempo em função da concentração de SSV (mg SSV.L⁻¹) após a etapa de contato com a biomassa e o cloro.

