UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

IVO GABRIEL GUEDES ALVES

**Descoloração de efluente têxtil em reatores anaeróbios de leito estruturado e de biomassa
livre**

Versão Corrigida

São Carlos

2020

IVO GABRIEL GUEDES ALVES

Descoloração de efluente têxtil em reatores anaeróbios de leito estruturado e de biomassa livre

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Titular Dr. Eugenio Foresti

Versão Corrigida

São Carlos

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

A474d Alves, Ivo Gabriel Guedes
Descoloração de efluente têxtil em reatores anaeróbios de leito estruturado e de biomassa livre / Ivo Gabriel Guedes Alves; orientador Eugenio Foresti. São Carlos, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2020.

1. Efluente têxtil. 2. Descoloração redutiva. 3. Direct Black 22. 4. Reator Anaeróbio. 5. Crescimento suspenso. 6. Crescimento aderido. 7. DGGE. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **IVO GABRIEL GUEDES ALVES**.

Título da dissertação: "Avaliação da remoção de cor por biomassa adaptada em reatores anaeróbios de leito estruturado e de crescimento suspenso".

Data da defesa: 03/09/2020.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Eugenio Foresti**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Profa. Dra. **Sávia Gavazza dos Santos Pessoa**
(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovado

Profa. Dra. **Silvana de Queiroz Silva**
(Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendonço**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

*À minha mãe Sílvia,
que tornou tudo possível.*

AGRADECIMENTOS

Chegando nesse ponto e olhando para trás, é difícil imaginar esse momento sem a participação de tantas pessoas que de tantas formas me ajudaram para que eu chegasse até aqui, dando o melhor de mim nessa tarefa e sempre buscasse construir uma versão melhor de mim mesmo.

Por isso sou grato, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e que permitiu que eu desfrutasse dessa oportunidade, cuidando de mim ao colocar todas essas pessoas nesse trecho da minha trajetória.

Agradeço aos meus pais, Sílvia Néli e Anderson Alves, pela doação de suas vidas por amor aos filhos para que pudéssemos ter as melhores oportunidades, oferecendo apoio em todas as circunstâncias, incondicionalmente.

Aproveito para agradecer aos meus familiares, em especial: meu avô José Guedes, exemplo na minha vida; minha irmã Amanda Caroline, amiga e parceira; meus tios Donaldo e Selma que estiveram de braços abertos para me receber e dar assistência quando necessária.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eugenio Foresti pelo voto de confiança ao aceitar me orientar nesse caminho sempre de forma presente e zelosa frente às dificuldades, pelo conhecimento passado de forma paciente e compreensiva e pela amizade. Obrigado pelo referencial de pessoa e profissional que se tornou para mim. Aproveito para agradecer também à Profa. Dra. Marcia Damianovic pela atenção com o bem-estar e palavras de conforto aos alunos durante esse período de trabalho.

À Andreza Borba, minha parceira e pessoa mais próxima nessa jornada, compartilhando de perto todos os momentos importantes sempre com amor, cuidado, paciência e compreensão em cada situação. Obrigado por ter vindo junto e dividido essa experiência.

Aos meus amigos Williane V. Macedo e Rodrigo M. Valença que participaram de cada etapa desse processo desde a concepção até o término, me oferecendo apoio, físico ou imaterial, sem o qual muito do que foi, não teria sido. Obrigado por terem acreditado, motivado e me mostrado o caminho quando eu me senti desorientado. Obrigado pela amizade.

Às técnicas do LPB Isabel K. Sakamoto, Carolina Sabatini, Maria Ângela Adorno e Eloisa Pozzi que com muito profissionalismo, empatia e solidariedade se fizeram presentes em diferentes etapas da caminhada e contribuíram para a qualidade do resultado final deste trabalho.

Aos técnicos laboratoriais do IQSQ Guto e Benê que gentilmente me receberam e deixaram abertas as portas do laboratório para utilização do equipamento e finalização das análises dentro do prazo.

Aos amigos de longa data Lucas Lopes, Gustavo Gama, Diogo Rayan e Lucas Alves que me ouviram em situações difíceis, riram comigo quando eu precisei e me ajudaram a levantar quando eu caí.

À Profa. Dra. Ivete Lopes Vasconcelos que me incentivou nesse caminho e sempre esteve de portas abertas para qualquer socorro que eu viesse a necessitar. Pela amizade, consideração, ensinamentos e oportunidades dadas, obrigado.

Aos amigos que fiz durante essa curta estadia que fizeram me sentir mais em casa e me ajudaram a construir boas memórias: Felipe Brandão, Alexandre Rodrigues, Ana Paula Gonçalves, André Borges e Priscila Dândaro.

Aos colegas de laboratório que aliviaram a rotina e que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento do trabalho Jean Oliveira, Luciana Pirete, Rômulo Mota, Heitor Roger, Felipe Eng, Jeny Ventura, Natália Silveira, Fabrício Motteran, Maria Eduarda, Jaqueline Cardoso, Lucas Fuess.

Finalmente, muito obrigado ao programa PPGSHS/EESC/USP e as agências de financiamento FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e FAPESP - Projeto temático 2015/06246-7.

Obrigado!

*“Nisto tu tinhas razão, porque o
segredo da existência humana reside
não apenas em viver, mas também em
saber para que se vive”*

Fiódor Dostoiévski, em Os irmãos Karamázov.

RESUMO

ALVES, Ivo Gabriel Guedes. **Descoloração de efluente têxtil em reatores anaeróbios de leito estruturado e de biomassa livre**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

O tratamento biológico de efluentes têxteis é uma alternativa aos processos físico-químicos convencionais. Devido à complexidade acerca dos mecanismos de degradação nesses efluentes, não há consenso em relação à configuração ideal de reator a ser utilizada no tratamento biológico. Neste trabalho, avaliou-se duas configurações de reatores biológicos visando à degradação do corante *Direct Black 22* em efluente têxtil sintético, a saber: um reator anaeróbio de leito estruturado (RA), onde há crescimento da biomassa aderido ao material suporte, e um reator anaeróbio de crescimento livre suspenso (RS). Os reatores foram alimentados com efluente têxtil sintético contendo DB22 ($32,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e glicose (1.000 mg.L^{-1}). O desempenho dos reatores foi comparado em quatro períodos operacionais, diferenciadas pelo tempo de detenção hidráulica (TDH) (24, 18, 12 e 6 horas). Os principais parâmetros de desempenho avaliados foram as eficiências de remoção de matéria orgânica e de cor. Ambos os reatores demonstraram robustez na descoloração, sem grandes impactos diante das variações de TDH, com médias globais de remoção de $81,33 \pm 5,54\%$ e $73,11 \pm 9,72\%$ em RA e RS, respectivamente. Embora as eficiências de descoloração dos reatores tenham sido semelhantes durante quase toda a operação, o desempenho do RA foi superior em todos os períodos estudados. O bom desempenho dos reatores no pH médio afluente alcalino de $9,87 \pm 0,40$ indica a possível presença de organismos alcalifílicos no consórcio microbiano. A conversão de sulfatos foi estável durante toda operação, indicando que houve o estabelecimento da sulfetogênese paralelamente ao processo de descoloração redutiva, sem prejuízos deste último. As eficiências globais de remoção de sulfato foram de $76,29 \pm 6,99\%$ em RA e $69,46 \pm 9,23\%$ em RS. O acúmulo de enxofre elementar nos reatores sugere possível oxidação de sulfetos pelo azo. A eficiência de remoção global de DQO nos reatores foi baixa, principalmente, à inibição da atividade metanogênica, atingindo $33,95 \pm 13,91\%$ em RA e $23,75 \pm 6,69\%$ em RS. A DQO remanescente mostra a necessidade de uma etapa de pós-tratamento. A análise de DGGE indicou que houve aumento da diversidade microbiana com a diminuição do TDH nos reatores.

Palavras-chave: Efluente têxtil; Descoloração redutiva; *Direct Black 22*; Reator Anaeróbio; Crescimento suspenso; Crescimento aderido; DGGE.

ABSTRACT

ALVES, Ivo Gabriel Guedes. **Decolorization of textile effluent in anaerobic reactors with structured bed and free biomass**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

The biological treatment of textile effluents is an alternative to conventional physical-chemical processes. Due to the complexity of the degradation mechanisms in these effluents, there is no consensus regarding the ideal reactor configuration to be used in biological treatment. In this work, two configurations of biological reactors were evaluated aiming at the degradation of the Direct Black 22 dye in synthetic textile effluent, namely: an anaerobic structured bed reactor (RA), where there is growth of the biomass adhered to the support material, and a reactor anaerobic suspended free growth (RS). The reactors were fed with synthetic textile effluent containing DB22 (32.5 mg.L^{-1}) and glucose ($1,000 \text{ mg.L}^{-1}$). The performance of the reactors was compared in four operational periods, differentiated by the hydraulic detention time (HDT) (24, 18, 12 and 6 hours). The main performance parameters evaluated were the efficiency of removal of organic matter and color. Both reactors demonstrated robustness in discoloration, without major impacts in the face of HDT variations, with global removal averages of $81.33 \pm 5.54\%$ and $73.11 \pm 9.72\%$ in RA and RS, respectively. Although the discoloration efficiencies of the reactors were similar during almost the entire operation, the performance of the AR was superior in all periods studied. The good performance of the reactors in the affluent alkaline pH of 9.87 ± 0.40 indicates the possible presence of alkaliphilic organisms in the microbial consortium. The conversion of sulfates was stable throughout the operation, indicating that there was the establishment of sulfetogenesis in parallel with the reductive discoloration process, without loss to the latter. The overall sulfate removal efficiencies were $76.29 \pm 6.99\%$ in RA and $69.46 \pm 9.23\%$ in RS. The accumulation of elemental sulfur in the reactors suggests possible oxidation of sulfides by azo. The efficiency of global COD removal in the reactors was low, mainly due to the inhibition of methanogenic activity, reaching $33.95 \pm 13.91\%$ in RA and $23.75 \pm 6.69\%$ in RS. The remaining COD reveals the need for a post-treatment. DGGE analysis indicated that there was an increase in microbial diversity with a decrease in TDH in the reactors.

Keywords: Textile effluent; Reductive discoloration; Direct Black 22; Anaerobic reactor; Suspended growth; Adhered growth; DGGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de corantes sintéticos, com destaque para a classificação do corante <i>Direct Black 22</i>	32
Figura 2 - Corante azo <i>Direct Black 22</i> ($C_{44}H_{32}N_{13}Na_3O_{11}S_3$).	32
Figura 3 - Árvore de métodos de tratamento para efluentes têxteis	35
Figura 4 - Redução redox na degradação de corantes azo por bactérias.	44
Figura 5 - Formas de espécies de sulfeto em meio aquoso e sua prevalência relativa de acordo com o valor do pH.	52
Figura 6 - Métodos de degradação de corantes azo. DE= doador de elétrons; RM = Mediador Redox; b = Bactéria.	53
Figura 7 - Perfis de difusividade de corante a partir da massa líquida até a fase biológica. (a) Biofilme em partícula impermeável; (b) Agregado celular; (c) Biofilme em partícula porosa. q_p : Concentração do corante na fase sólida.	56
Figura 8 - Meio de cultura com corante inoculado antes (esq.) e depois (dir.) da descoloração.	60
Figura 9 - Modelos dos reatores. (A) Reator com meio suporte. (B) Reator de crescimento suspenso. (C) Corte do reator 'A' (D) Corte do reator 'B'.	64
Figura 10 - Imagens dos reatores RA e RS recém inoculados com meio fermentado.	67
Figura 11 - Fluxograma do procedimento experimental para a quantificação da biomassa aderida às matrizes de poliuretano.	72
Figura 12 - Abertura de reator e biomassa coletada para análises de biologia molecular em RA (A) e RS (B).	75
Figura 13 – Gráfico de dispersão de eficiências de remoção de cor por varredura em RA e RS durante o período de inoculação.	77
Figura 14 – Varredura das correntes afluentes e efluentes de RA e RS no dia 29 do período de inoculação.	78
Figura 15 – Pellet de biomassa efluente de RA e RS no início (A) e no fim (B) do período de inoculação.	79
Figura 16 - Curva F obtida no ensaio hidrodinâmico em degrau para os reatores RA e RS com TDH de 24 horas	80
Figura 17 – Varredura do espectrofotômetro de amostras afluentes e efluentes de RA e RS no tratamento do corante DB22; destaque para a área de detecção de aminas aromáticas e absorção do corante.	82
Figura 18 – Amostras do efluente antes do tratamento (A) e após o tratamento (B).	83
Figura 19 – Gráfico boxplot de eficiência global de remoção de cor em RA e RS para varredura (A) do espectro e leitura do ponto de maior absorbância (B).	84
Figura 20 – Relação concentração afluente de carboidratos e remoção de cor em RA e RS.	85
Figura 21 - Eficiência média de remoção de cor por período de operação em RA e RS.	88
Figura 22 – Varredura espectral da região UV de amostras em PIII de operação em RA (A) e RS (B).	91
Figura 23 – Gráfico boxplot de carga orgânica volumétrica aplicada aos períodos operacionais.	93
Figura 24 – Gráfico de dispersão de carga orgânica volumétrica, DQO afluente e DQO efluente de RA durante a operação.	93
Figura 25 - Gráfico de dispersão de carga orgânica volumétrica, DQO afluente e DQO efluente de RS durante a operação.	94

Figura 26 – Gráfico de tendência da eficiência de remoção de DQO durante o experimento nos quatro períodos operacionais.....	95
Figura 27 – Gráfico de dispersão dos valores de pH afluente (afl) e efluente (efl) em RA e RS durante os períodos de operação.	100
Figura 28 – Concentração de ácidos orgânicos voláteis no efluente dos reatores RA (A) e RS (B).....	102
Figura 29 – Percentual médio relativo de AOV nos reatores por etapa operacional em RA (A) e RS (B).....	103
Figura 30 – Concentração média de ácidos orgânicos voláteis totais no efluente dos reatores durante os períodos experimentais.	106
Figura 31 – Gráfico boxplot de concentrações globais de sulfatos afluente e efluente em RA e RS.....	107
Figura 32 – Concentrações afluente e efluente de sulfatos em RA e RS e respectivas eficiências de remoção por período operacional.	108
Figura 33 – Abundância relativa máxima de acetatos por oxidação incompleta de sulfatos em RA e RS.....	112
Figura 34 – Gráficos de dispersão de distribuição da concentração teórica e medida de sulfetos no efluente em RA (A) e RS (B).	114
Figura 35 – Material acumulado nas saídas (A e B) e leito (C e D) dos reatores.	115
Figura 36 – Concentrações de sulfeto teóricas e observadas em RA (A) e RS (B).	117
Figura 37 – Condutividade média de entrada e saída medida durante a operação.	119
Figura 38 – Bandas de DGGE para o domínio Bacteria classificados alfanumericamente.	121
Figura 39 – Gel e dendograma das amostras coletadas durante o período experimental.	122
Figura 40 – Relação entre índices de diversidade (A) e dominância (B) e eficiência em remoção de cor DQO.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas do processo têxtil.....	28
Tabela 2 - Métodos espectrofotométricos de determinação de cor em águas ou efluentes.....	36
Tabela 3 – Valores de remoção de cor e DQO encontrados na literatura em condições mesofílicas e pH neutro a levemente alcalino.	48
Tabela 4 - Composição do efluente têxtil sintético com corante e cossustrato e macronutrientes.	63
Tabela 5 - Composição da solução estoque de micronutrientes ao adicionada ao efluente têxtil sintético a 1mL.L ⁻¹	63
Tabela 6 - Variação de carga orgânica e de corante durante os períodos de operação nos reatores.	67
Tabela 7 - Composição da amostra para análise de ácidos em cromatografia gasosa.	68
Tabela 8 - Frequência semanal de realização de análises de monitoramento	70
Tabela 9 - Primers utilizados para amplificação das regiões V6-V8 do 16S rDNA do domínio Bacteria na técnica de PCR.	74
Tabela 10 – Distribuição de períodos de operação.....	76
Tabela 11 – Resultados reportados na literatura de eficiência de remoção de cor do corante DB22 considerando apenas sistemas anaeróbios ou microaerados.....	87
Tabela 12 – Eficiências médias de remoção de cor por fase.....	88
Tabela 13 – Índices ecológicos de diversidade (Shannon), dominância (D) e riqueza (Chao) em cada reator durante o experimento e eficiências associadas de remoção de cor e DQO.....	123
Tabela 14 – Concentração média de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV).	125

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

Abs	Absorbância
ADMI	American Dye Manufacturer Institute
AOV	cidos orgânicos voláteis
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CI	Color Index
CR	Congo Red
COV	Carga orgânica volumétrica
CSTR	Continuous stirred tank reactor, em português reator contínuo de mistura completa
CVC	Carga volumétrica de corante
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DB22	Direct Black 22
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DNA	cido Desoxirribonucleico, do inglês deoxyribonucleic acid
DQO	Demanda química de oxigênio
ETE	Esto de tratamento de esgoto
FAD	Flavin adenine dinucleotide
MC	Meio de cultura
MCC	Meio de Cultura com corante
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
DCIP	Dichlorophenolindophenol
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potencial hidrogeninico
RA	Reator aderido
RB5	Reactive Black 5
RNA	Ribonucleic acid
RS	Reator suspenso

SBR	Sequence Batch Reactor
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
STV	Sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UA	Unidade de absorbância
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1. Indústria têxtil: Visão e perspectivas.....	28
3.2. Corantes têxteis.....	29
3.3. Corantes azo: Classificação e toxicidade.....	31
3.4. Processos de remoção de corantes azo em águas residuárias.....	33
3.4.1. Avaliação de cor: Métodos de medição	35
3.5. Alternativa sustentável: Sistemas de tratamento biológico.....	36
3.5.1. Biossorção.....	37
3.5.2. Enzimas do processo de descoloração	38
3.6. Sistemas de tratamento com bactérias	41
3.7. Fundamentos do mecanismo de descoloração reductiva.....	44
3.7.1. Adição de cossubstrato.....	44
3.7.2. Fatores do corante que afetam a taxa de reação.....	45
3.7.3. Fatores ambientais que afetam taxa de reação	47
3.7.4. Redução Química por Sulfetos	50
3.7.5. Rotas reacionais	52
3.8. Mineralização incompleta: Aminas aromáticas	53
3.9. Crescimento de biomassa.....	54
3.9.1. Material Suporte: Métodos de imobilização e difusividade.....	55
3.9.2. Crescimento Suspenso x Crescimento Aderido	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1. Inóculo	59
4.1.1. Ativação da Biomassa.....	59
4.1.2. Reprodução do inóculo	60
4.2. Efluente têxtil sintético.....	61
4.2.1. Solução estoque de corante	61
4.2.2. Composição da água residuária.....	62
4.3. Sistema experimental	64
4.3.1. Estrutura dos reatores.....	64

4.3.2	Suporte de imobilização de biomassa	65
4.3.3	Ensaio hidrodinâmico.....	65
4.3.4	Inoculação	66
4.4.	Métodos analíticos	67
4.1.	Análise da composição dos precipitados no lodo de fundo	70
4.2.	Avaliação de remoção de cor	70
4.3.	Aminas aromáticas qualitativas	71
4.4.	Quantificação da biomassa aderida.....	72
4.5.	Análise de Biologia Molecular	73
4.5.1.	Amostragem e Preservação	73
4.5.2.	Extração de DNA	74
4.5.3.	Reação em cadeia polimerase (PCR)	74
4.5.4.	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	75
5.	RESULTADOS	76
5.1.	Considerações iniciais.....	76
5.2.	Ensaio Hidrodinâmico.....	79
5.3.	Remoção de cor e formação de aminas aromáticas.....	81
5.3.1.	Remoção do corante <i>Direct Black 22</i>	81
5.3.2.	Aminas aromáticas	90
5.4.	DQO e COV	92
5.5.	pH e Ácidos Orgânicos Voláteis	98
5.5.1.	pH.....	98
5.5.2.	Ácidos Orgânicos Voláteis.....	101
5.6.	Sulfatos e Sulfetos	107
5.6.1.	Sulfatos.....	107
5.6.2.	Sulfetos.....	113
5.7.	Sais	118
5.8.	Análise de diversidade por DGGE	120
5.8.1	Análise multivariada do perfil de banda	120
5.8.2	Índices ecológicos	123
5.9.	Sólidos e quantificação de biomassa aderida	125
6.	CONCLUSÕES	127
APÊNDICE		144

1. INTRODUÇÃO

A indústria têxtil brasileira existe há mais de 200 anos e é enquadrada como o 2º maior setor de empregos na indústria de transformação, com 1,7 milhões de empregados em 27,5 mil empresas em todo território nacional. Com forte influência no cenário mundial, o Brasil possui a maior cadeia têxtil completa do ocidente, constantemente atraindo investidores e a criação de novos produtos (ABIT, 2018). O processo de confecção têxtil é composto por várias etapas em que, muitas destas, dependem do consumo de grandes volumes de água, sendo gastos cerca de 50-100L de água por quilo de tecido processado. Entre essas, a fase de tingimento, onde se confere cor às fibras de tecido pela aplicação de corantes sintéticos, corresponde a uma das de maior consumo de água, aplicados em processos de banho de tingimento e lavagem (SENTHIL KUMAR; GUNASUNDARI, 2018). Esse procedimento é responsável pela geração de águas residuárias ricas em produtos químicos complexos, sólidos dissolvidos e demanda química e biológica de oxigênio. A alta taxa de geração desses rejeitos constitui um dos maiores passivos ambientais da cadeia de processos produtivos dessa indústria do ponto de vista ambiental e sanitário (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016).

O efluente gerado é caracterizado pela coloração proveniente dos corantes sintéticos aplicados que não foram aderidos às fibras de tecido. O volume final de efluente gerado chama a atenção para o risco de alteração das características físico-químicas dos corpos receptores (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). Entre as consequências do despejo indiscriminado desses efluentes estão a redução de incidência luminosa ao longo da profundidade, contaminação da vida aquática por resíduos tóxicos e alteração dos padrões estéticos com a mudança da coloração natural da água. O manejo adequado destes efluentes constitui um desafio econômico, social e ambiental.

No Brasil, o problema ainda enfrenta dificuldades para ter a urgência reconhecida, principalmente devido à relativa abundância de recursos hídricos no território nacional, não obstante a escassez hídrica em algumas das regiões onde estão instalados grandes polos de produção. Os corantes sintéticos enquadram-se como poluentes emergentes, não sendo, portanto, incluídos em programas de monitoramento, nem em legislação de qualidade ambiental apesar de serem frequentemente introduzidos no ambiente. Por isso, a legislação brasileira é pouco específica com relação ao descarte de efluentes contendo corantes, ressaltando apenas que estes devem ser virtualmente ausentes ou removíveis por ciclos de tratamento convencionais. A Resolução CONAMA nº 357 publicada em 2005, estabelece as condições e padrões para o lançamento de efluentes industriais, incluindo o potencial de causar efeitos tóxicos ao corpo

receptor. Adicionalmente, em 2011, a publicação da Resolução CONAMA nº 430 complementa a Resolução nº 357 ao estabelecer critérios para a cobrança do atendimento aos parâmetros de toxicidade pelos órgãos ambientais administrativos competentes.

Em alguns locais ainda é comum o lançamento direto desse tipo de rejeito em mananciais, sem qualquer tipo de tratamento prévio, contando apenas com sua capacidade de diluição e autodepuração para mitigação dos impactos. A situação mais comum, no entanto, é a utilização de estações de tratamento utilizando processos físico-químicos, em etapas de coagulação, floculação e sedimentação. Esses sistemas são mantidos em situações precárias devido à ausência de estudos que estabeleça os parâmetros operacionais adequados e, por isso, não costumam atender plenamente aos padrões estabelecidos na legislação. Tal situação decorre do pouco investimento direcionado à solução do problema, resultante da fiscalização deficiente, custos envolvidos e falta de conscientização dos gestores de indústrias, que buscam apenas evitar sanções financeiras por parte do poder público (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016).

Apesar de resultarem em bons índices de remoção de cor, os métodos convencionais físico-químicos de tratamento de águas residuárias, além do seu alto custo inerente, se mostram insuficientes para remoção completa dos compostos de cor que são altamente estáveis e recalcitrantes. Diversos métodos de tratamento vêm sendo desenvolvidos para atender especificamente à remoção de corantes sintéticos em águas residuárias. Entretanto, ainda não há um sistema geral definitivo. Apesar da predominância dos tratamentos físico-químicos, como coagulação, floculação e sedimentação e adsorção, os sistemas de tratamentos biológicos têm conquistado espaço nas pesquisas e buscado aderência efetivamente nas operações industriais. Por serem mais econômicos e eficientes, além de gerarem menor quantidade de rejeito a ser disposto, a consolidação dessa tecnologia pode contribuir para alavancar a prática do tratamento de efluentes nas indústrias têxteis do território nacional.

Comunidades biológicas de bactérias e fungos têm demonstrado potencial para desenvolver diferentes mecanismos de estabilização dos corantes sintéticos (SARATALE et al., 2011). Similarmente aos processos de remoção de matéria orgânica que ocorrem em reatores de estações de tratamento de esgoto (ETE), grupos de bactérias em condições específicas são capazes de promover a mineralização e descoloração total de efluentes têxteis. A literatura é enfática ao abordar vantagens no tratamento anaeróbio em águas residuárias contendo corantes, pois a condição estabelece potencial redox favorável à quebra redutiva de moléculas de corante (SINGH; SINGH; SINGH, 2015).

Todavia, os fundamentos e condições de ocorrência dos mecanismos de descoloração de muitas dessas comunidades de microrganismos ainda não são totalmente conhecidos e a aplicação

generalizada ainda não é factível. Tópicos como a eficiência de remoção alcançada, tempo de operação no reator ou condições de controle ambiental necessárias ainda são objeto de estudo para aperfeiçoamento da técnica. A geração de conhecimentos acerca destes processos de biodegradação de corantes sintéticos agrega valor a um arcabouço de proposições de tecnologias viáveis de mitigação dos problemas causados pelos efluentes gerados na indústria têxtil.

Em consideração a isso, o trabalho aqui apresentado tem como principal objetivo avaliar comparativamente o desempenho na remoção de cor de um consórcio microbiano em meios de crescimento livre e aderido a meio suporte em reatores anaeróbios contínuos. O consórcio usado como inóculo foi previamente obtido por Oliveira (2019) a partir de resíduos de material lignocelulósico e adaptado ao corante azo comercial *Direct Black 22*, o qual também foi utilizado nesse estudo. Microrganismos que crescem nesse tipo de substrato são capazes de produzir diversas enzimas associadas à degradação de material orgânico complexo, incluindo anéis aromáticos com ligações azo. Portanto, são alternativas em potencial para aplicação em sistemas de tratamento de efluentes industriais têxteis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar a remoção de cor em reatores anaeróbios acidogênicos de leito estruturado (RA) e de crescimento em suspensão (RS) inoculados com consórcio de microrganismos adaptados, observando-se eventuais diferenças na estrutura das comunidades microbianas e na eficiência de descoloração do corante azo *Direct Black 22*.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar níveis de remoção de cor obtidos pelo tratamento nos reatores RA e RS;
- Verificar a produção e acúmulo de subprodutos tóxicos detectáveis na faixa ultravioleta;
- Comparar o desempenho dos reatores na remoção de sulfato e ocorrência simultânea à remoção de cor;
- Avaliar de níveis de eficiência de remoção de matéria orgânica;
- Comparar níveis de similaridade entre as comunidades microbianas estabelecidas nos reatores RA e RS mediante análise de DGGE e comparação com parâmetros físico-químicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Indústria têxtil: Visão e perspectivas

No Brasil, a indústria têxtil tem participação importante na economia nacional. O país dispõe de uma cadeia produtiva completa, das matérias primas até os produtos finais, sendo o 5º maior provedor de produtos neste mercado mundial. Com um faturamento médio de aproximadamente US\$ 54 bilhões ao ano entre os anos de 2013 e 2015, representando cerca de 5% de toda indústria de transformação, a indústria têxtil se destaca como um dos principais setores de produção no mercado, com 33 mil empresas distribuídas no território nacional (ABIT, 2018; CNI - UNIDADE DE NEGÓCIOS INTERNACIONAIS - NEGINT, 2014).

As etapas do processo produtivo e produtos utilizados foram resumidos, de forma geral, na Tabela 1 descrita por Dos Santos, Cervantes e Van Lier (2007). Ressalta-se que cada instalação industrial tem suas variações a depender do nível de modernização da fábrica e políticas ambientais.

Tabela 1 - Etapas do processo têxtil

Ordem	Processo	Descrição	Produtos mais frequentemente empregados	Geração de efluente
1	Engomagem	Dá trabalhabilidade à fibra e evita quebras durante a tecelagem	Amido, álcool polivinílico e carboximetilcelulose	NÃO
2	Desengomagem	Lavagem para remoção de excesso de agentes da engomagem	-	SIM
3	Limpeza e desengorduramento	Remoção de impurezas, como ceras, gorduras e surfactantes da fibra natural	Hidróxido de sódio	SIM
4	Branqueamento	Remoção de cor indesejada das fibras	Hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogénio	SIM
5	Merceirização	Empregada para melhorar o brilho e favorecer a fixação de corante	Cloreto de sódio e outros sais, hidróxido de sódio	SIM
6	Tingimento	Adiciona cor às fibras	Corantes, metais, sais, surfactantes, sulfato e formaldeído	SIM
7	Lavagem	Retira o excesso de produtos usados no tingimento dos tecidos	-	SIM
8	Finalização	Preparação dos tecidos para venda	-	NÃO

Fonte: Adaptado de Dos Santos, Cervantes e van Lier (2007)

Apesar de toda a relevância econômica, os processos produtivos desta indústria gera complicações do ponto de vista ambiental (CERVANTES; SANTOS, 2011). A operação é dependente de um enorme consumo de água devido ao processamento úmido dos tecidos (ROBINSON et al., 2001). Estes produtos englobam sais, ligantes, espessantes, ácidos, ceras, ureia, surfactantes, que são incorporados ao efluente final, caracterizado principalmente pela elevada coloração e teores de sais e sulfatos (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007a; SARAYU; SANDHYA, 2012). Os efluentes são tipificados por teores elevados de sólidos dissolvidos, sólidos totais, DQO/DBO, sais, variações no pH e temperatura e presença de metais pesados como Cr, Zn, Cu e Al. Outros produtos químicos para dar brilho, evitar dobras, engomar, amaciar, repelir fungos, ácaro, traças também são utilizados e são conhecidos por sua toxicidade e baixa biodegradabilidade (DAVE; PATEL; TIPRE, 2015; SARAYU; SANDHYA, 2012).

O efluente gerado traz vários problemas de ecotoxicidade para as espécies aquáticas devido às características tóxicas, carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas dos produtos químicos empregados, além de subprodutos de degradação (SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007a; VAN DER ZEE, 2002). Os produtos contaminam a vida aquática, além de alterar a cor e turbidez do corpo receptor, bloqueando a entrada de luz do sol, prejudicando a fotossíntese e diminuindo a quantidade de oxigênio disponível para a biota aquática (FAHMI; ABIDIN; RAHMAT, 2010). Com uma taxa DBO/DQO variando entre 0,2 e 0,5, observa-se que estes efluentes tem uma alta fração de matéria orgânica não-biodegradável, considerando que são considerados efluentes com boa degradabilidade os que possuem relação $DBO/DQO > 0,6$ (CHEN et al., 2003; SOLÍS et al., 2012; VON SPERLING, 1998).

Visando aderir a modelos de desenvolvimento sustentável que são uma exigência emergente de mercado, a indústria têxtil tem buscado aderência aos requisitos de produção mais limpa (P+L). Tais práticas podem ser aplicadas aos produtos e serviços por substituição do uso de matéria-prima tóxica; economia de insumos, água e energia; e redução dos resíduos gerados, entre estes, os efluentes têxteis (QUEIROZ et al., 2016). Fabricantes de corantes, por exemplo, já buscam desenvolver produtos que possam ser aplicados utilizando menos reagentes químicos auxiliares, como sais inorgânicos dissolvidos (ANJANEYULU; SREEDHARA CHARY; SAMUEL SUMAN RAJ, 2005).

3.2. Corantes têxteis

Dentre os produtos empregados no processo produtivo, a utilização de uma variedade de corantes sintéticos, durante a etapa de tingimento das fibras têxteis, é um dos receios centrais

(SHAMEY; ZHAO, 2014). Entende-se como fibras têxteis os materiais de origem animal, vegetal ou mineral aptos para aplicação têxtil devido a características como a elevada relação comprimento/diâmetro, flexibilidade, suavidade, elasticidade, resistência, tenacidade e finura (CONMETRO, 2008). Sobre estas, aplicam-se os corantes, substâncias que, quando aplicados a um substrato, refletem seletivamente a luz incidente conferindo cores específicas (CLARKE; ANLIKER, 1980).

A variedade de fibras utilizadas na indústria gerou uma demanda por diferentes tipos de corantes que tenham maior afinidade ao substrato utilizado em relação ao meio. Esta afinidade está relacionada à existência de ligações iônicas, covalentes ou ligações fracas, como ligações de Van der Waals ou ligações de hidrogênio (GUARATINI; ZANONI, 1999; IARC, 2010; PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003). O resultado disso são mais de 100.000 corantes hoje comercialmente disponíveis com 8.000 diferentes estruturas químicas, com aplicações distribuídas na indústria têxtil (60%), alimentícia, farmacêutica, papel e tinta (MOLINARI et al., 2004; ROBINSON et al., 2001). Com tamanha variedade disponível, a associação de produtores de corantes desenvolveu, em 1976, o índice de cor (*Color Index - CI*) para classificação de corantes. Uma vez conhecida a estrutura química de um corante, uma combinação de 5 dígitos é associada a ele, além de um nome genérico fazendo associação à classificação do corante seguido pelo matiz aparente, *e.g.*, *CI Acid Yellow 35* (CI 13065) (SANDHYA, 2010).

O receio com o uso desses produtos reside na quantidade despendida no processo que, por conseguinte, é despejada no meio ambiente, dado que a fixação dos mesmos às fibras de tecido nunca ocorre integralmente (de 50% a 98%). A baixa fixação decorre da presença de corantes hidrolisados não-reativos que impede a aderência aos grupos hidroxila da celulose da fibra. Estima-se que cerca de 40-65L de efluente é gerado por quilo de tecido produzido durante o processo de colorização, podendo facilmente extrapolar esse volume a depender do tipo de corante aplicado nos processos de tingimento (MANU; CHAUDHARI, 2002; SOLÍS et al., 2012). Nestes efluentes, a concentração de corantes pode variar de 10 a 250 mg.L⁻¹, sendo já detectáveis mesmo em concentrações de 1 mg.L⁻¹ (O'NEILL et al., 1999a; SARANRAJ; MANIGANDAN, 2018; SARAYU; SANDHYA, 2012; SUDHA et al., 2018).

Os corantes apresentam estruturas complexas, com combinações de anéis aromáticos e outros grupos moleculares que proporcionam estabilidade e resistência diante de fatores adversos tais como luz, água e compostos químicos. Outros critérios para de seleção são o grau de fixação, intensidade de cor, solubilidade e uniformidade no processo de coloração (CARMEN; DANIELA, 2012; GUARATINI; ZANONI, 1999; ROBINSON et al., 2001). Com uma demanda anual de produção de corantes avaliada em 7x10⁵ ton e uma estimativa de descarte de 10 a 15% desse valor

nos corpos hídricos, a preocupação com o destino desses compostos torna-se uma demanda urgente do meio ambiente (SARAYU; SANDHYA, 2012). Em países em desenvolvimento, por exemplo, águas residuárias contendo corantes azo são comumente utilizadas na irrigação de grãos e, sem tratamento, esses corantes passam para o solo, alterando suas propriedades biológicas e composição de comunidades microbianas e atividade enzimática (TOPAÇ et al., 2009).

Os corantes são principalmente caracterizados por um grupo molecular específico não saturado, denominado cromóforo, que atua como um aceptor de elétrons em reações de oxirredução. Sua função é mudar a absorção de radiação na faixa do visível em comprimentos de onda específicos, que garantem a reflexão determinada coloração no substrato. Entre os principais cromóforos estão: etileno ($=C=C=$), carbonila ($=C=O$), metino ($-CH=$), carbono-enxofre ($=C=S$ ou $=C-SSC=$), nitro ($-NO_2$ ou $-NO-OH$) e azo ($-N=N-$). Com base na estrutura química dos cromóforos, considera-se que existam entre 20-30 grupos de corantes, sendo azo, antraquinona, trihalometanos e ftalocianina entre os principais (CARMEN; DANIELA, 2012; MOHAMMAD; AZEEZ, 2005).

Além deste, outro grupo funcional importante são os auxocromos, substituintes de retirada ou doação de elétrons que aumentam a afinidade do corante pelas fibras e intensificam a cor refletida pelo cromóforo ao alterar o nível de energia geral do sistema de elétrons. Exemplos de auxocromos são grupos amina ($-NH_3$), carboxil ($-COOH$), sulfonado ($-SO_3H$) e hidroxil ($-OH$) (MOLINARI et al., 2004; SARAYU; SANDHYA, 2012; SHAH, 2014).

3.3. Corantes azo: Classificação e toxicidade

Os corantes azo, caracterizados pela presença do cromóforo $-N=N-$ na estrutura orgânica, são extensivamente aplicados nas indústrias têxteis, sendo esta a maior e mais importante classe de corantes comerciais, com cerca de 70% de aplicação em nível global (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007b; SARATALE et al., 2011). A dominância no mercado se deve à gama de tons brilhantes, variados métodos de aplicação e à resistência de exposição à água que estes corantes proporcionam (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003). Grupos azo, de forma geral, são ligados a anéis de benzeno ou naftaleno, mas também podem estar ligados em ambos os lados a moléculas aromáticas heterocíclicas ou grupos alifáticos enolizáveis (BARDI; MARZONA, 2010).

Uma maneira de classificar corantes azo é pelo número de ligações azo que a molécula do corante possui. São denominados como mono, di, tri, tetra ou poli-azo, corantes azo com uma, duas, três, quatro ou múltiplas ligações azo, respectivamente. Outra forma de classificar toma como base as características dos processos onde são aplicados para que, com a modificação da

molécula, atinjam melhores níveis de fixação às fibras têxteis. Nesta divisão, os corantes azo podem ser: Ácidos, diretos, reativos, dispersivos, etc (BARDI; MARZONA, 2010; GUARATINI; ZANONI, 1999). Esta classificação permite ainda a segregação dos corantes em três grupos de acordo com sua ionização em meio aquoso: aniônicos (diretos, ácidos e reativos), catiônicos (básicos) e não-iônicos (dispersivos). Os cromóforos encontrados em corantes aniônicos e não-iônicos são, em maioria, dos tipos azo ou antraquinona (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; ROBINSON et al., 2001; SRINIVASAN; VIRARAGHAVAN, 2010).

Figura 1 - Classificação de corantes sintéticos, com destaque para a classificação do corante *Direct Black 22*.

Fonte: Autor.

O corante *C.I. Direct Black 22 C.I. 35435 (DB22)* (**Figura 2**), escolhido para este trabalho, é amplamente utilizado em indústrias de tecidos, impressão, papel e couro e sua biodegradação já vem sendo estudada no Brasil de mercado e apresentam forte ligação com algodão ainda na ausência de mordente¹, sendo aplicados a temperaturas entre 79,4 – 93,3 °C. O uso desses corantes vem aumentando significativamente com o passar dos anos, tendo um crescimento registrado de 53,848 toneladas em 1992 para 181,998 toneladas em 2011. O aumento representa um crescimento de cerca de 237,98% (GHALY et al., 2013).

Figura 2 - Corante azo *Direct Black 22* ($C_{44}H_{32}N_{13}Na_3O_{11}S_3$).

¹ Agente de ligação que conecta corantes a fibras têxteis.

Fonte: Adaptado de *World Dye Variety*.

A recalcitrância dos corantes azo está, principalmente, ligada à presença de grupos sulfonados e às ligações azo, dois fatores considerados xenobióticos. A ligação azo e os grupos sulfonados, que tendem a propiciar a retirada de elétrons do centro reacional molecular, resultam em deficiência de elétrons no sistema do composto, tornando-o menos suscetível ao catabolismo oxidativo por microrganismos (SOLÍS et al., 2012). O número de ligações azo na molécula, portanto, afeta a degradação do corante, de modo que quanto mais ligações azo existam na molécula, menor será a taxa de descoloração (SANDHYA, 2010). Além do número de ligações azo, outros fatores como posição das ligações, tipo de grupo substituinte e massa molecular são diretamente determinantes para definir o grau de resiliência dos compostos azo, como será ainda apresentado (IMRAN et al., 2014).

Estudos apontam maior potencial mutagênico em efluentes têxteis, quando comparados a outros efluentes industriais, além de efeitos tóxicos. Esses efeitos, porém, estão relacionados com a estrutura e localização dos grupos substituintes na molécula. Por exemplo, há evidências que corantes azo sulfonados têm efeito mutagênico reduzido ou nulo quando comparados a corantes não sulfonados, devido à sua carga elétrica e baixa lipossolubilidade, que dificulta sua absorção e metabolismo. Enquanto isso, corantes contendo grupos nitro, metil, metoxi ou átomos halogênios podem aumentar a toxicidade e provocar mutações (KHAN; BAANERJEE, 2010; MOHAMMAD; AZEEZ, 2005). A maior parte dos corantes azo são solúveis em água e absorvíveis pelo contato com a pele e inalação, podendo provocar reações alérgicas, dermatoses, irritação nos olhos, eczemas e, quando inalados ou ingeridos, podem ser degradados no fígado, rins e trato gastrointestinal formando subprodutos capazes de induzir câncer na bexiga e tumores em animais, afetar os pulmões, sistema circulatório, de imunidade e reprodutivo (BARDI; MARZONA, 2010; MOHAMMAD; AZEEZ, 2005; SHAH, 2014).

Outros trabalhos apontam que os corantes azo contribuem para atividade mutagênica em águas de superfície e subterrâneas. A descarga em águas superficiais também causa problemas estéticos, obstrução da penetração de luz e transferência de oxigênio nos corpos hídricos (PANDEY; SINGH; IYENGAR, 2007).

3.4. Processos de remoção de corantes azo em águas residuárias

Com os efeitos adversos causados pelos efluentes têxteis, o tratamento é parte essencial no descarte final do rejeito. Existem diversos métodos aplicáveis na remoção de corantes em águas residuárias têxteis (Figura 3). Esses métodos podem ser classificados em relação à natureza física,

química ou biológica. Fatores como o tipo de corante, a composição da água residuária, dosagem e custos de produtos químicos, custos de operação, destino ambiental e custo de manejo de rejeitos ajudam a determinar a viabilidade de cada técnica em situações particulares, tendo todas elas suas próprias limitações e vantagens intrínsecas (SHAH, 2014; VAN DER ZEE, 2002). Uma única solução universal não é, porém, factível, pois, a complexidade dos produtos de composição das águas residuárias têxteis, em razão das variantes de processo e rotinas sazonais, torna inviável a remediação completa com um único método.

A implementação dos métodos físico/químicos se mostra ainda predominante nas estações de tratamento de efluentes dessa natureza por serem capazes de alcançar bons resultados em termos de remoção de cor, com níveis de eficiência superiores a 90%. Mas, apesar disso, trazem consigo desvantagens importantes, como custo de operação (energia e produtos químicos), mineralização incompleta dos corantes azo recalcitrantes e seus metabólitos e alto teor de geração de lodo (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004; ZHANG et al., 2004).

Por outro lado, os métodos biológicos de degradação utilizam os mecanismos naturais de microrganismos e enzimas, e se apresentam como uma alternativa ecologicamente viável e de custo competitivo para enfrentar o problema quando comparados aos métodos físico-químicos. O resultado nesses métodos é a geração de produtos finais não-tóxicos ou completamente mineralizados, a depender da eficiência do processo aplicado (RAI et al., 2005; VERMA; MADAMWAR, 2002). No entanto, pela complexidade dos efluentes têxteis, decorrente da grande variedade de produtos utilizados, não existe ainda um método, ou uma combinação de métodos, definitivamente eficazes para qualquer situação. Por esse motivo, o potencial de uso dos microrganismos para descoloração de corantes específicos para atingir este objetivo tem sido amplo tema de discussão (GUADIE et al., 2017; SARATALE et al., 2011; SINGH; SINGH; SINGH, 2015, 2019; SOLÍS et al., 2012).

Entre os principais obstáculos e desafios impostos ao tratamento biológico dos efluentes têxteis com corantes azo estão a recalcitrância, a toxicidade e a salinidade (MENEZES, 2016). É válido salientar como fator limitante do tratamento microbiano a incapacidade de se estabelecer o potencial ecotoxicológico absoluto dos produtos de degradação formados, visto que os compostos azo podem gerar produtos ainda mais perigosos após serem reduzidos ou terem a cor removida (RAWAT; MISHRA; SHARMA, 2016).

Figura 3 - Árvore de métodos de tratamento para efluentes têxteis

Fonte: Adaptado de Saratale (2011).

3.4.1. Avaliação de cor: Métodos de medição

O espectro eletromagnético é dividido em três regiões: ultravioleta, luz visível e infravermelho. A cor pode ser facilmente identificada e percebida qualitativamente dentro da luz visível através da observação do olho humano. Todavia, para uma medida mais precisa e quantificável, métodos analíticos se fazem necessários. De forma geral, a literatura classifica a cor das águas em cor verdadeira² e cor aparente³, a depender dos interferentes presentes na amostra (DOS SANTOS, 2005; SANDHYA, 2010; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007a). Os métodos hoje mais comumente aplicados para medir cor em soluções aquosas são baseados em técnicas de comparação visual e espectrofotometria. Os métodos visuais são baseados na comparação e observação de amostras com (a) solução de cor padrão, geralmente de cloreto de platina e cobalto, (b) razão de diluição⁴ e (c) métodos de transparência⁵ (BISSCHOPS; SPANJERS, 2003). O método visual Platina-Cobalto é comumente utilizado em amostras de água potável, mas se mostra inadequado para quantificar intensidade de cor em rejeitos têxteis pela complexidade de cor, com possíveis picos de absorbância em vários pontos do espectro visível (CARMEN; DANIELA, 2012; SANDHYA, 2010).

Nos métodos espectrofotométricos, o protocolo difere entre as metodologias, sendo os mais comumente aplicados o método de filtro Tristimulus, método filtro Tristimulus da *American Dye Manufacturer Institute* (ADMI), e registro espectral (Tabela 2) (CARMEN; DANIELA, 2012; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007a).

² Medição de cor livre de interferências de turbidez.

³ Cor medida sem tratamento prévio.

⁴ A amostra é diluída com água destilada até que fique límpida. O número de diluições realizadas é a medida de cor.

⁵ Distância máxima que um ponto de observação pode ser visto através da amostra. Altamente suscetível à presença de sólidos e dependente unicamente do olho humano.

Tabela 2 - Métodos espectrofotométricos de determinação de cor em águas ou efluentes.

Método	Descrição
Tristimulus	Três filtros de luz tristimulus são combinados com uma fonte específica de luz (<i>i.e.</i> , lâmpada de tungstênio) e uma célula fotoelétrica dentro de um filtro fotométrico. A transmissividade de saída é convertida a um coeficiente tricromático associado a uma escala de cor;
ADMI Tristimulus	O valor de cor <i>ADMI</i> traduz a medida de cor verdadeira, independente do matiz. A depender do número de comprimentos de onda selecionados para calcular o valor <i>ADMI</i> , o método pode ser diferenciado em 3 comprimentos de onda <i>ADMI</i> (a transmissividade é registrada em 590, 540 e 438 nm) ou 31 comprimentos de onda <i>ADMI</i> ⁶ .
Registro espectral	O espectro luminoso é completamente registrado, podendo ser comparada uma região ou toda a varredura. Uma modificação do método sugere que áreas abaixo de uma curva de extinção ⁷ representem a intensidade de cor.

Fonte: Adaptado de Carmen e Daniela (2012) e dos Santos et al. (2007).

Nesses métodos, antes da medição, a amostra deve passar por tratamento prévio para remoção de turbidez e ajuste de pH (7,4-7,6) (SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007a). Neste trabalho, foi utilizado o método de registro espectral, com varredura em todo o espectro luminoso e no comprimento de onda de máxima absorbância ($\lambda_{m\acute{a}x}$) do corante estudado, com ajuste no pH das amostras para 7,6.

3.5. Alternativa sustentável: Sistemas de tratamento biológico

Os sistemas de biorremediação são comumente aplicados no tratamento de efluentes industriais utilizando vários organismos como bactérias, fungos, plantas e algas capazes de acumular e degradar diferentes poluentes. As principais vantagens atreladas a esse sistema são a possível aplicação das técnicas *in situ*⁸; a viabilidade ambiental das tecnologias de bioprocessamento, com pouco ou zero acúmulo de rejeitos; e o fato de a aplicação *ex situ*⁹ ter custo competitivo.

O tratamento de efluentes têxteis por degradação biológica envolve a adaptação de microrganismos aos resíduos tóxicos, selecionando cepas resistentes, as quais têm a capacidade de

⁶ A transmissividade é determinada a cada 10nm no intervalo de 400-700nm.

⁷ Curva baseada no efeito combinado de absorção e dispersão de luz em um comprimento de onda.

⁸ Que é feito no local onde a contaminação é gerada.

⁹ Que é feito fora do local onde a contaminação foi gerada.

transformar os compostos tóxicos em formas menos prejudiciais. O procedimento para a remoção de cor por biodegradação de compostos recalcitrantes no sistema microbiano é baseado no uso de enzimas de biotransformação e ocorre com a redução ou oxidação do cromóforo azo, em condições aeróbias ou anaeróbias/anóxicas (SARATALE et al., 2011; SINGH et al., 2015). A redução pode envolver mecanismos, além das enzimas, de mediadores redox de baixo peso molecular e redução química por agentes redutores biogênicos (*e.g.* sulfeto), que podem agir simultaneamente em ação combinada em sítios de reação intra ou extracelular (SINGH; SINGH; SINGH, 2015). Entre todos os agentes biológicos que podem promover a descoloração de azos, grupos de fungos e bactérias têm atraído mais atenção devido aos vários processos que vêm sendo descobertos nos últimos anos que mostram que a) a descoloração de corantes por bactérias anaeróbias tem mostrado ampla aplicabilidade aos corantes utilizados na indústria com eficiências satisfatórias e b) há uma variedade de espécies destes microrganismos que contém sistemas ligninolíticos (SEN et al., 2016). Este sistema enzimático ligninolítico possui capacidade de degradação de vários poluentes recalcitrantes (ZHAO; HARDIN; HWANG, 2006).

A lignina é um polímero aromático complexo característico da parede celular de plantas vasculares, altamente resistente às degradações, tanto químicas, quanto biológicas. A conexão deste polímero com os corantes azo reside no fato de ambos possuírem estrutura orgânica similar de grupos substituintes. Tal fato permite considerar a viabilidade da degradação de corantes azo por meio da utilização de enzimas que degradem também lignina (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009). O sistema enzimático degrada lignina através de reações em cadeia de radicais livres, degradando vários compostos aromáticos, entre eles, os corantes azo (HAN et al., 2014). A descoloração biológica pode ocorrer via bioadsorção, degradação enzimática ou combinação de ambas (RAMACHANDRAN et al., 2013; SOLÍS et al., 2012).

3.5.1. Bioadsorção

A bioadsorção é definida como o acúmulo de compostos químicos por adsorção na biomassa. O uso desta técnica traz vantagens, especialmente para efluentes têxteis de elevada toxicidade, para os quais as condições para o crescimento e manutenção da população microbiana são menos viáveis. A capacidade de bioadsorção de um microrganismo se dá graças aos compostos de heteropolissacarídeos e lipídios presentes na parede celular, que contém grupos funcionais (amino, hidroxil, fosfato), provocando forças de atração entre os corantes e a parede celular. A capacidade de bioadsorção pode ser otimizada por processos de pré-tratamento como autoclavagem e ruptura celular, com consequente aumento da área superficial de adsorção (SOLÍS et al., 2012).

A efetividade da bioissorção está atrelada a fatores ambientais como pH, temperatura, força iônica, tempo de contato, adsorvente, concentração e estrutura do corante e tipo de microrganismo (ROBINSON et al., 2001; SOLÍS et al., 2012). Como bioissorventes, células mortas têm vantagens em relação às células vivas por não haver demanda de nutrientes, poderem ser armazenadas para reuso posterior e possível uso por longos períodos, além de poderem ser recuperadas para reuso aplicando solventes orgânicos ou surfactantes para dessorção (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Como a adsorção por biomassa é um processo que ocorre por troca de íons, a depender da espécie de microrganismo empregada, diferentes taxas de adsorção poderão ser observadas. A bioissorção tende a ocorrer rapidamente, sendo necessários apenas alguns minutos em algas, ou algumas horas, no caso de bactérias, para ocorrência do fenômeno. Contudo, a interação corante-microrganismo variará de acordo com as espécies químicas do corante e da biomassa em particular. Sendo assim, é possível sugerir que certos corantes podem apresentar afinidade ótima com comunidades microbianas específica (HU, 1996; ROBINSON et al., 2001).

3.5.2. Enzimas do processo de descoloração

A literatura já reporta diversas enzimas envolvidas com a degradação de corantes, incluindo enzimas redutivas como azorredutases (AFTAB et al., 2011) e redutases não específicas (NADH-DCIP redutase) (TELKE et al., 2009); e enzimas oxidativas como lignina-peroxidases (DAWKAR et al., 2010), manganês-peroxidase (VERMA; MADAMWAR, 2002), lacases (KHLIFI et al., 2010), tirosinases (KABRA; KHANDARE; GOVINDWAR, 2013). Destes grupos enzimáticos, três têm demonstrado maior potencial de alcance e eficiência: azorredutases, lacases e peroxidases (IMRAN et al., 2014; SINGH; SINGH; SINGH, 2015).

3.5.2.1. Azorredutases

As enzimas azorredutases são a maior família de enzimas a se manifestar em bactérias e fungos ligados à degradação e descoloração de corantes, estando diretamente ligadas à degradação de compostos azo. São enzimas citosólicas redutivas com estrutura flavoproteicas, capazes de catalisar a redução e quebra ligações azo em ação conjunta com um agente redutor (*e.g.* NADH; NADPH; FADH₂). Podem ser específicas para um corante em particular ou agir em uma variedade de corantes. Logo, para tornar o efeito biológico efetivo, é indicado o uso de microrganismos capazes de produzir azorredutases com ampla compatibilidade de substrato (CHEN; HOPPER; CERNIGLIA, 2005; SINGH; SINGH; SINGH, 2015, 2019). Estas enzimas apresentam maior taxa de eficiência em ambientes anaeróbios/anóxicos, embora haja estudos que apontem alguns

microrganismos sintetizadores de azorredutases que promovem descoloração ainda que na presença de oxigênio (IMRAN et al., 2014; STOLZ, 2001). A ação das azorredutases envolve a quebra redutiva da ligação azo, formando suas respectivas aminas aromáticas (PANDEY; SINGH; IYENGAR, 2007).

É aceito na literatura que proteínas com atividade azorredutase possam ocorrer intra ou extracelularmente. Entretanto, a ação de azorredutases intracelulares em processos de descoloração de corantes vem sendo questionada nos últimos anos. A indagação decorre da elevada polaridade e estrutura molecular complexa observada em corantes azo que pode comprometer a sua passagem pela membrana celular onde ocorreria a reação. Apesar disso, a atividade enzimática de azorredutase intracelulares tem sido reportada na literatura. Estas enzimas podem ser encontradas em vários organismos, como no fígado de animais e na microbiota intestinal (SARATALE et al., 2011; SINGH; SINGH; SINGH, 2015, 2019; TELKE et al., 2009).

Azorredutases podem ser classificadas de acordo com sua função como azorredutases flavina-dependente e flavina-independente. As flavina-dependente utilizam o agente redutor como doador de elétrons. Outra classificação utiliza como base a análise dos aminoácidos. Como os aminoácidos do nível primário tem baixa homologia, é difícil usa-los na classificação, entretanto foi possível classifica-los com base nos níveis secundário e terciário. (CHEN; HOPPER; CERNIGLIA, 2005; SINGH; SINGH; SINGH, 2015, 2019). A atividade dessas enzimas leva à formação de diferentes metabólitos com toxicidade e susceptibilidade à seguinte mineralização variável.

3.5.2.2. Lacases

Lacases são o tipo mais comum de enzimas no grupo de glicoproteínas oxidativas cobre-dependentes que têm atividade fenol oxidase abrangente. A presença do cobre, que confere coloração azulada para a enzima, é o que, de fato, é responsável pela oxidação do substrato. Ao fazer uso do oxigênio molecular, conseguem oxidar compostos aromáticos e não aromáticos ao abstrair prótons e criar radicais fenoxi que são novamente oxidados pela enzima formando um íon carbônio, cuja carga está localizada no carbono do anel fenólico contendo a ligação azo. Após isto, um ataque nucleofílico por uma molécula de água à molécula do corante provocando sua quebra, culminando na liberação de subprodutos que são prontamente degradáveis na presença de oxigênio (IMRAN et al., 2014; SEN et al., 2016; SINGH; SINGH; SINGH, 2015). Por esse motivo, em virtude da natureza dos reatores deste estudo, é pouco provável a ação desse tipo de enzima na descoloração que foi observada.

Diferente das azorredutases, que podem produzir subprodutos tóxicos, lacases realizam a descoloração de corantes sem a formação de subprodutos intermediários tóxicos, além de conseguirem degradar os que forem formados por outros microrganismos (IMRAN et al., 2014). Lacases são pouco específicas, sendo, portanto, capazes de promover a descoloração em de águas residuárias têxteis complexas e também conseguem fazer uso de mediadores redox no seu processo de degradação (IMRAN et al., 2014). A maior parte das lacases conhecidas tem origem em fungos ou plantas, todavia, já foram identificada atividade dessa natureza em bactérias (SINGH; SINGH; SINGH, 2015). O estudo de D'SOUZA et al. (2006) avaliou a descoloração de efluentes têxteis industriais por fungos marinhos isolados, sendo as lacases a enzima de degradação mais produzida por esses fungos. O experimento foi realizado sob temperatura de 60 °C, em meio de cultura enriquecido com glicose, peptona, extrato de levedura e ágar em água salgada, em pH ótimo de 3,0 e 6,0. Os autores observaram que a secreção da enzima pelos microrganismos foi estimulada pela presença de corantes específicos (*Brilliant Green*) no meio aquoso.

3.5.2.3. Peroxidases

Peroxidases são enzimas contendo oxidorredutases que catalisam reações utilizando peróxidos (ROOH) como aceptores de elétrons. Constituem uma família de enzimas ubíqua, produzida por quase todos os organismos vivos e podem conter grupos heme na sua composição proteica (IMRAN et al., 2014; SINGH; SINGH; SINGH, 2015). Koua et al. (2009) classificaram as heme peroxidases em seis grupos com base no organismo, estrutura primária e substrato: (i) peroxidase não-animal, (ii) peroxidase animal, (iii) catalase, (iv) haloperoxidases, (v) di-heme citocromo-c peroxidase e (vi) família peroxidase tipo DyP. O mecanismo de degradação é semelhante ao que ocorre nas lacases, com a particularidade da mudança de acceptor de elétrons, utilizando peróxidos no lugar do oxigênio. A degradação do corante ocorre sem a formação de metabólitos tóxicos, extra ou intracelularmente (IMRAN et al., 2014).

O tratamento exclusivamente enzimático poderia ser uma alternativa para mineralização de corantes em efluentes têxteis com potencial descarte seguro no meio ambiente, trazendo vantagens como maior especificidade, melhor padronização, fácil manejo e independência de taxas de crescimento microbiano. Porém, desvantagens cruciais como o custo associado à elevada quantidade de enzimas a serem produzidas para tratar grandes volumes de águas residuárias, considerando sua baixa taxa de produção e sensibilidade à inativação mediante variações de temperatura, pH e contaminantes inviabilizam esta técnica em escala industrial (IMRAN et al., 2014; MUKHERJEE et al., 2013).

Ao contrário do que acontece nos tratamentos físico-químicos onde há adição contínua de produtos para manutenção do rendimento sistema, os microrganismos são aplicados uma vez apenas na água residuária, onde se perpetuam, multiplicando-se durante seu crescimento nas moléculas de corante. (IMRAN et al., 2014; SARATALE et al., 2011; SOLÍS et al., 2012). Considerando todos os agentes enzimáticos que podem estar envolvidos na degradação dos corantes azo e rotas de degradação, a descoloração azo é compreendida como um processo não-específico. De fato, a literatura já reporta que um mesmo corante, quando tratado por microrganismos distintos, é capaz de gerar produtos de degradação distintos (JADHAV et al., 2010; RAWAT; MISHRA; SHARMA, 2016; STOLZ, 2001; TELKE et al., 2009). Estudos revelam que a ação das enzimas de biotransformação pode ser estimulada pela presença dos corantes no meio reacional, de modo tal que a atividade enzimática é significativamente maior ao fim dos processos de descoloração em batelada. Somado a isto, múltiplas enzimas podem ser induzidas simultaneamente durante o processo, a depender da estrutura do corante (SOLÍS et al., 2012).

3.6. Sistemas de tratamento com bactérias

Como já mencionado, as possibilidades de tratamento de efluentes têxteis com fungos e bactérias na mineralização de corantes têm sido alvo de pesquisas dadas suas potenciais vantagens. Porém, o tratamento com fungos, microrganismos predominantemente aeróbios, ainda enfrenta obstáculos na sua aplicabilidade como: (1) longo ciclo de crescimento que demanda maior período de retenção hidráulica para descoloração completa, (2) menor flexibilidade frente à complexidade do efluente têxtil e (3) limitações nutricionais, uma vez que a degradação de estruturas aromáticas por fungos é um evento metabólico secundário que só se manifesta quando os nutrientes (C, N, S) estão a uma concentração mínima. Logo, com enzimas atuando em condições limitantes, fontes de energia e nutrientes ainda são necessárias para o crescimento das populações (CHEN et al., 2003; SHAH, 2014; SWAMY; RAMSAY, 1999).

Diferentemente, as bactérias têm maior facilidade de crescimento, genética altamente adaptável e distribuição extensiva. Os mecanismos responsáveis pela degradação são também baseados na ação de enzimas de biotransformação (SARATALE et al., 2011; SEN et al., 2016). Ademais, Bandounas (2010) discute que as enzimas de bactérias podem ser superiores às provenientes de fungos no tratamento com relação a critérios como especificidade, estabilidade térmica e dependência de mediadores, além de possuírem ótima versatilidade no metabolismo de compostos aromáticos à base de lignina, sendo os processos de degradação até mais específicos

do que os que ocorrem com os fungos. Por estes fatores, a descoloração bacteriana se destacou (PARMAR; SHUKLA, 2017).

A literatura reporta diversos estudos que demonstraram total capacidade de mineralização de corantes azo por determinadas culturas isoladas de bactérias (BATTAN; SHARMA, 2018; CHANG et al., 2001; CHEN et al., 2003; EL BOURAIE; EL DIN, 2016; HUSSAIN et al., 2013; KHALID; ARSHAD; CROWLEY, 2008; THAKUR et al., 2014). Estes estudos enfatizam vantagens do uso de culturas puras tais como (i) desempenho previsível e conhecimento detalhado sobre os caminhos de degradação, sendo então possível determinar os caminhos da mineralização do corante para que não haja produtos finais tóxicos em dado cenário ambiental, (ii) a densidade populacional bacteriana pode ser monitorada ao longo do tempo por processos de biologia molecular para análise quantitativa da cinética de descoloração e mineralização do corante azo (KHALID; ARSHAD; CROWLEY, 2010).

Contudo, populações bacterianas isoladas geralmente desenvolvem mecanismos específicos para degradação de um único tipo de corante. Frente à complexidade do efluente têxtil industrial, um processo microbiano mais eficiente se faz necessário (SOLÍS et al., 2012). Para isso, o emprego de um consórcio microbiano com alta diversidade catabólica mostra-se como uma alternativa capaz de sanar as limitações das culturas puras em efluentes dessa natureza. No consórcio, cepas individuais podem atacar a molécula do corante em diferentes posições ou, ainda, utilizar produtos de decomposição de outra cepa para degradação posterior, podendo atingir a mineralização completa, acurando o processo de descoloração.

Esta relação de sinergia, contudo, dificulta a avaliação dos caminhos de degradação. A atividade enzimática de cada cepa é altamente influenciada pela presença de outros microrganismos. Portanto, não é válido sugerir a atividade enzimática resultante do consórcio como o somatório das respectivas atividades enzimáticas das comunidades individuais (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; SOLÍS et al., 2012). Este aspecto foi verificado na observação feita nos estudos de Waghmode et al. (2011) e Kurade et al. (2012) com consórcio de *Galactomyces geotricum* (GG) e *Brevibacillus laterosporus* (BL). Neste consórcio, a atividade da enzima *Veratryl alcohol oxidase* (presente apenas na BL), apresentou um aumento de 340% quando comparada com a atividade na BL isoladamente. Analogamente, o oposto também ocorreu quando observaram que a atividade da riboflavina redutase, Tyr, NADH-DCIP e azorredutase foi inferior no consórcio em relação à atividade nos microrganismos isoladamente.

O consórcio pode ser constituído, além de bactérias, também por fungos ou até uma combinação de ambos. Porém, o uso de fungos nos consórcios microbianos se torna menos viável tendo em vista a exigência de baixo pH (4-4,5) para desempenho ótimo de muitas das enzimas

relacionadas. Além disso, a necessidade de oxigênio os torna inviáveis à aplicação em processos mediados por bactérias anaeróbias. Esta faixa de pH pode inibir o crescimento de demais culturas úteis ao consórcio e também é conflitante com a variação nos valores de pH encontrada em águas residuárias têxteis que pode atingir valores altamente alcalinos (10-11) a depender da cadeia de processos e produtos utilizados (CHEN et al., 2003; IMRAN et al., 2014; SOLÍS et al., 2012; SWAMY; RAMSAY, 1999; YANG et al., 2009).

Um contraponto à utilização dos consórcios é a variabilidade da composição da cultura mista no decorrer do tempo do processo de decomposição, o que ainda dificulta o controle do uso desse recurso enquanto tecnologia, pois, na construção do consórcio, a proporção da cada microrganismo é determinante no resultado de eficiência que será obtida (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004; RAMACHANDRAN et al., 2013; SOLÍS et al., 2012).

A redução enzimática por bactéria pode ocorrer sob condições anaeróbias/anóxicas ou aeróbias. Todavia, a redução enzimática de corantes azo mostram-se mais resistentes em ambientes aeróbios e estão mais ligados à anaerobiose pelo simples fato de o oxigênio ser um aceptor de elétrons mais eficiente que o corante azo na oxidação do portador de elétron. Esta característica dá uma finalidade prática ao corante, tornando-o mais resistente e diminuindo assim sua degradabilidade. A presença do oxigênio inibe a atividade de redução da ligação azo, uma vez que a respiração aeróbia deve dominar o uso da coenzima NADH, transferindo os elétrons do NADH para o oxigênio, e não para a redução da ligação azo (CHANG et al., 2001; CHEN et al., 2003). A literatura reporta extensivamente maior eficiência dos processos anaeróbios na atividade de descoloração em relação aos processos aeróbios, exceto em alguns corantes de estrutura simples (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004; KHOUNI; MARROT; AMAR, 2012; O'NEILL et al., 1999b; PANDEY; SINGH; IYENGAR, 2007; SINGH; SINGH; SINGH, 2015; SOLÍS et al., 2012). Corantes contendo grupos sulfonados são ainda mais impraticáveis para ação de microrganismos aeróbios por terem dificuldade na passagem para o interior da célula (CHEN et al., 2003; GURULAKSHMI; SUDAR; VENBA, 2008).

Em ambiente anaeróbio, é possível alcançar o potencial de oxirredução $\leq -50\text{mV}$ necessário para descoloração efetiva de corantes. Nestas condições, a remoção de cor é conhecida como descoloração redutiva e envolve a redução da ligação azo, com sua posterior quebra. (SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007a; SHAH, 2014). Na presença de outros aceptores, como sulfato ou nitrato, os corantes azo podem enfrentar competição por elétrons e a descoloração ocorrerá em paralelo com outros processos oxirredução. Esse fenômeno e outros princípios da descoloração redutiva serão abordados tópico a seguir (RASOOL; MAHMOUD; LEE, 2015).

3.7. Fundamentos do mecanismo de descoloração redutiva

O mecanismo de descoloração redutiva envolve, basicamente, a clivagem da ligação azo (-N=N-) sob condições anaeróbias por intermédio de enzimas azorredutases. A ligação azo, portanto, atua comoceptor final de elétrons na oxidação de um composto doador de elétrons. O resultado é a quebra da ligação azo, perdendo a capacidade de refletir cor e liberando os metabólitos resultantes da quebra no meio reacional. O processo de clivagem da ligação azo exige a transferência de quatro equivalentes de redução (Figura 4), *i.e.*, 32 mg de DQO por ligação. Esta transferência acontece em dois estágios na ligação azo e, em cada estágio, dois elétrons são transferidos ao corante (CHANG et al., 2001; SHAH, 2014). Dada a natureza da reação descrita, a presença de um doador de elétrons adequado é parte essencial para viabilizar a redução das ligações azo.

Figura 4 - Redução redox na degradação de corantes azo por bactérias.

Fonte: Adaptado de Gurulakshmi et al. (2008).

3.7.1. Adição de cossubstrato

Apesar da natureza orgânica, existem poucas bactérias conhecidas que sejam capazes de utilizar corantes azo como fonte de carbono no seu crescimento. Por isso, fontes alternativas de material orgânico são necessárias para promover a descoloração (SARAYU; SANDHYA, 2012). O efluente têxtil poderia ser capaz de suprir à demanda com a matéria orgânica proveniente de outros rejeitos da cadeia produtiva presentes em sua composição. Entretanto, a composição dos efluentes têxteis é altamente variável em seus parâmetros, que variam de acordo com os processos executados e produtos utilizados na fabricação (RASOOL; MAHMOUD; LEE, 2015; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007a). A variação nesses parâmetros se reflete no teor de matéria orgânica disponível na água residuária, que pode estar diretamente relacionada com a concentração

de doadores de elétrons viáveis ao processo de descoloração. Assim, é presumível que o efluente, apenas, pode não ser suficiente para dispor os doadores de elétrons necessários ao processo redutivo sob operação com efluentes têxteis reais.

Para suprir a essa necessidade, a literatura sugere a adição de cossustratos ao efluente, capazes de fornecer equivalentes de redução em nível suficiente. Por exemplo, Rasool et al. (2015) relatam o uso de glicose e lactato; Chinwetkitvanich et al. (2000) fizeram uso de tapioca; Braúna et al. (2009) utilizaram etanol; Amorim et al. (2013) fizeram uso de sacarose; Tony et al. (2009) empregaram amido; e Mohanty et al. (2006) fizeram uso, além de glicose e amido, de ácidos graxos, acetato, propionato e butirato. A escolha do cossustrato é ponderada por questões de custo, compatibilidade com os corantes e influência sobre a cinética da reação de redução (CAO et al., 2012). Dentre estes, a glicose se apresenta na literatura consistentemente como a mais fácil e eficiente fonte de carbono para o metabolismo microbiano, e sua adição tem mostrado melhoria estável de eficiência em degradação de corantes azo (CHIRANJEEVI; NARESH KUMAR; VENKATA MOHAN, 2014; FRANCISCON et al., 2009; GUADIE et al., 2017; KUMAR; REDDY; MOHAN, 2015; MOHANA et al., 2008; SOLÍS et al., 2012). A desvantagem ao uso de cossustratos é o custo da adição contínua desses compostos. Além disso, por serem de fácil assimilação, também podem vir a ser utilizados por outros microrganismos não relacionados à degradação de corantes, minando parte do seu potencial (FORSS; WELANDER, 2011).

Com o aumento da demanda por elétrons resultante de processos metabólicos ocorrendo paralelamente à descoloração redutiva, há um aumento na demanda por esses equivalentes redutivos. Se insuficientes, estabelece-se no meio uma competição por estes elétrons. Por ser um processo biológico de cinética relativamente lenta em relação a outros mecanismos comuns na digestão anaeróbia, a descoloração redutiva pode encarar desvantagem competitiva. Para remediar a questão, o aumento na concentração primária deste substrato pode maximizar a taxa de descoloração (FERRAZ et al., 2011; PARMAR; SHUKLA, 2017; VAN DER ZEE; VILLAVERDE, 2005). Van der Zee e Villaverde (2005) relatam diversos estudos em que a concentração do cossustrato é aplicada em excesso em relação à quantidade estequiometricamente necessária à redução azo para garantir equivalentes de redução suficientes para descoloração total, tendo sido obtida eficiência satisfatória.

3.7.2. Fatores do corante que afetam a taxa de reação

Existem fatores ambientais e inerentes ao corante alvo capazes de afetar sensivelmente as taxas reacionais de descoloração. A compreensão destas características é determinante para

conhecer as cinéticas de reação aplicáveis a um processo de tratamento, além do controle de fatores ambientais, a fim de aprimorar as condições reacionais.

Estudos reportam que a velocidade das reações em processos de descolorização está próxima a um modelo cinético de primeira ordem com relação à concentração do corante, embora também tenham sido observados comportamentos de ordem zero em alguns casos (PANDEY; SINGH; IYENGAR, 2007). A concentração do corante, quando muito baixa, está atrelada a baixas taxas de descoloração. Isto se deve possivelmente ao fato de que a quantidade de substrato é insuficiente para que seja reconhecida pela enzima de descoloração (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003). Ao mesmo tempo, concentrações elevadas de corante também podem inibir as taxas de descoloração pelo aumento da toxicidade da presença do corante (LI; GUTHRIE, 2010).

A estrutura molecular do corante também exerce relevância. A literatura reporta que corantes com estrutura simples e de baixo peso molecular exibem altas taxas de descoloração enquanto que a remoção de cor é menor em corantes com muitos grupos substituintes e alto peso molecular. A possível razão é que estes últimos, por sua estrutura, não conseguem penetrar a membrana celular facilmente e ir para o interior da célula onde poderiam ser degradados por enzimas intracelulares. (FORSS; WELANDER, 2011; LU; LIU, 2010; PANDEY; SINGH; IYENGAR, 2007; PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; RIEGER et al., 2002; SANDHYA, 2010). Corantes com grupos que retiram elétrons do meio (*e.g.* SO_3^-) são mais facilmente degradáveis do que corantes com grupos que liberam elétrons ($-\text{NH}$ -triazina). O efeito é ainda maior se estes grupos estiverem na posição *ortho* da ligação azo no lugar da posição *meta*, pois assim são capazes de promover um efeito de ressonância mais eficiente, aumentando a afinidade elétrica dos corantes azo (SOLÍS et al., 2012). Por exemplo, a literatura reporta que corantes com grupos sulfonados foram reduzidos mais rapidamente do que corantes carboxilados por efeito da maior eletronegatividade do grupo sulfonado que torna o grupo azo mais acessível aos elétrons (KHALID; ARSHAD; CROWLEY, 2010).

A presença de grupos hidroxí na posição *ortho* do anel naftol possibilita a ação de azorredutases, e grupos carregados próximos ao grupo azo podem ser um obstáculo à sua quebra. Um segundo grupo substituinte polar na molécula do corante inibe a reação ao diminuir a afinidade com a enzima, enquanto que a substituição de grupos que retiram elétrons ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$) na posição *para* do grupo fenil da ligação azo pode aumentar a taxa de redução (WALKER; RYAN, 1971; ZIMMERMANN; KULLA; LEISINGER, 1982). Enquanto que corantes com baixa polaridade e grupos substituintes doadores de elétrons do tipo metil no anel aromático são mais recalcitrantes (KHALID; ARSHAD; CROWLEY, 2010). A descoloração também é afetada por mudanças na densidade de elétrons e ligações de hidrogênio na região do grupo azo. Como já

mencionado anteriormente, o número de ligações azo também é capaz de afetar a taxa de descoloração, sendo então corantes mono-azo mais rapidamente descoloridos em relação a corantes di ou poli-azos. Saratale et al. (2011) registram também que corantes diretos são mais facilmente degradáveis do que corantes ácidos ou reativos.

3.7.3. Fatores ambientais que afetam taxa de reação

Os fatores ambientais também podem mudar drasticamente as taxas de degradação dos corantes azo. Sendo variáveis de mais fácil controle e monitoramento, o seu conhecimento preciso pode tornar mais eficiente a operação. Alguns dos fatores ambientais de forte influência são: nível de agitação, disponibilidade de oxigênio, temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, concentração de sais e mediadores redox.

3.7.3.1. pH

O pH do efluente têxtil varia de acordo com os processos empregados na indústria, podendo ser alcalino, neutro ou ácido. A literatura reporta que o valor do pH pode afetar não só o crescimento e sobrevivência das populações microbianas, como também suas atividades, incluindo a biodegradação (HUSSAIN et al., 2013). Os melhores valores de pH variam de acordo com a população envolvida, entretanto, ainda não é estabelecido se os efeitos resultantes da variabilidade de pH se devem a fatores físicos ou influência direta na atividade metabólica dos microrganismos (BARDI; MARZONA, 2010). A faixa ideal de pH em processos de remoção de cor fica geralmente entre 6,0 e 10,0, sendo em muitos casos preferencialmente neutro a alcalino, o que é uma vantagem já que a maior parte dos processos industriais têxteis resultam em águas residuárias de pH elevado devido à melhor fixação do corante às fibras (FRANCISCON et al., 2009; GUADIE et al., 2017; HUANG et al., 2015; HUSSAIN et al., 2013; JONSTRUP et al., 2011; LALNUNHLIMI; VEENAGAYATHRI, 2016). A literatura apresenta diversos estudos de tratamento de corantes, realizados em pH próximo à neutralidade (Tabela 3).

As taxas de remoção, porém, tendem a cair drasticamente em ambientes muito ácidos ou alcalinos (SARATALE et al., 2011). Chen et al. (2003) descrevem que, em seu experimento, com o aumento do consumo de glicose, houve o aumento da taxa de acúmulo de ácidos orgânicos no meio. O acúmulo de ácidos diminuiu o pH e observou-se a inibição do crescimento bacteriano e atividade enzimática. Acredita-se, também, que o pH possa estar relacionado com o transporte da molécula do corante pela membrana celular (CHANG et al., 2001).

Tabela 3 – Valores de remoção de cor e DQO encontrados na literatura em condições mesofílicas e pH neutro a levemente alcalino.

DQO afluente (mg.L ⁻¹)	DQO média removida (%)	Cor média removida (%)	pH aplicado	Corante avaliado	TDH (horas)	Temperatura (°C)	Tipo de reator	Fonte
7.643	61	80	7,5	Disperse Red 1	72	30	Manta de lodo anaeróbio	Franciscon et al. (2015)
474	-	66,2 - 95,6	7	Acid Orange 7	8,8	25	Ascendente de filtro empacotado anaeróbio	Huang et al. (2015)
1.130	82	98	7,1-7,3	Remazol Red RR; Remazol Blue RR; Remazol Yellow RR	24	37	Leito móvel anaeróbio	Jonstrup et al. (2011)
1.600	92	90	7,0-7,2	Acid Black 10B	48	28	ASBR ¹⁰	Kumar et al. (2015)
1.500	75	98	7,5	Direct Red 80	48	35	ASBR	Rasool et al. (2015)
-	-	91	7	Direct Black 22	12	45	ASBR	Mohana et al. (2008)
2.018	27-37	92-97	6,8-7,0	Reactive Blue	20	28	UAFB ¹¹	Srivastava et al. (2013)
1.180	62	67	7,5	Efluente textil real	16	25	UASB	Amaral et al. (2017)
1.161	52/85	96,3/ 75	7	Congo Red; Reactive Black 5	24/12	27	UASB	Silva et al. (2012)
6.750	95	91-95	8,1	Reactive Orange 16	60	35	SAnMBR ¹²	Spagni et al. (2012)

Fonte: Autor.

¹⁰ Anaerobic Sequential Batch Reactor – Reatores anaeróbios sequenciais em batelada.¹¹ Upflow Anaerobic Fixed Biofilm – Reator anaeróbio de fluxo ascendente de biofilme fixo¹² Submerged Anaerobic Membrane Bioreactor – Reator anaeróbio de membrana submersa

3.7.3.2. Temperatura

A temperatura do ambiente influencia na atividade dos microrganismos uma vez que células microbianas se adaptam às mudanças de temperatura pelos mecanismos enzimáticos, além de também afetar taxas de crescimento e produção de biomassa. Grande parte das espécies microbianas degrada corantes a uma maior taxa sob temperatura entre 30-40 °C. A taxa de descoloração tende a crescer até atingir a temperatura ótima e após esse ponto, temperaturas elevadas podem diminuir a taxa de descoloração pela inviabilidade celular e desnaturação enzimática (CHANG et al., 2001; IMRAN et al., 2014; SARATALE et al., 2011).

3.7.3.3. Sais

Muitos sais são adicionados nos banhos de tingimento para melhorar a adesão do corante às fibras têxteis. Cerca de 40-100 g.L⁻¹ de sais (NaNO₃, NaCl e Na₂SO₄) são utilizados nas etapas de coloração, resultando águas residuárias com alta condutividade elétrica¹³. A alta concentração desses sais, particularmente íons cloreto, influencia fortemente as taxas de descoloração dos corantes pois, o aumento da pressão osmótica resulta em plasmólise e morte celular. (BARDI; MARZONA, 2010; IMRAN et al., 2014; MANU; CHAUDHARI, 2003).

3.7.3.4. Oxigênio e Agitação

A descoloração de corantes azo pode ocorrer em condições estritamente anaeróbias, facultativas ou aeróbias por diferentes grupos tróficos de bactérias. Todavia, a literatura reporta que o fenômeno ocorre rendimento bastante superior em condições anaeróbias e anóxicas com a descoloração redutiva. Como já mencionado, em competição com o oxigênio, o cromóforo azo não é eletronegativo suficiente para atrair equivalentes de redução necessários à quebra da ligação. Sob anaerobiose, a atividade redutiva das enzimas é maior, mas, ainda assim, um pequeno teor de oxigênio no meio pode ser útil para que enzimas oxidativas também possam contribuir com o processo, uma vez que ambas as enzimas oxidativas e redutivas participam simultaneamente da biodegradação. Dessa forma, a agitação e aeração, que visam o aumento de oxigênio no meio reacional, devem ser evitadas. Estudos apontam uma relação positiva entre o tempo de retenção hidráulica na fase anaeróbia e eficiência de remoção de cor (LU; LIU, 2010; SARATALE et al., 2011). A condição aeróbia é necessária, no entanto, para atingir a completa mineralização dos subprodutos de degradação da quebra de ligações azo como será visto no tópico a seguir. (BARDI; MARZONA, 2010; SARATALE et al., 2011).

¹³ A condutividade elétrica se refere à habilidade de uma solução salina em conduzir eletricidade, o que é diretamente correlacionável com a concentração de sais e pode ser facilmente medida com o uso de um condutivímetro (IMRAN et al., 2014)

É importante salientar que efluentes têxteis reais geralmente possuem elevada temperatura, pH e concentração de sais, necessárias aos processos de tingimento, especialmente no caso de corantes reativos. Estas condições podem inibir a sobrevivência de microrganismos e, por isso, a aplicação de culturas extremófilas tem certo apelo em tal circunstância (AMOOZEGAR et al., 2011; GAO et al., 2010; LALNUNHLIMI; VEENAGAYATHRI, 2016; SOLÍS et al., 2012)

3.7.4. Redução química por sulfetos

A redução extracelular é possível também por via química, através de redutores biogênicos inorgânicos, tais como os sulfetos e íons ferrosos, desde que o lodo contenha uma alta concentração quimicamente ativa dos mesmos. Tais compostos são formados durante as reações metabólicas anaeróbias por bactérias redutoras de sulfato¹⁴ (BRS) e redutoras de ferro, cujos substratos se encontram comumente em efluentes têxteis (SANDHYA, 2010). O equilíbrio na concentração desses compostos inorgânicos é determinante na ação microbiana, pois, ao ultrapassar determinado limiar, podem vir a inibir o crescimento de alguns microrganismos. Carliell et al. (1998) *apud* Imran et al. (2014), por exemplo, testaram o efeito de nitrato e sais de sulfato na descoloração do corante *Reactive Red 141* e observaram que a descoloração foi afetada pela concentração do nitrato, enquanto que não houve impacto pela presença de sulfato.

Águas residuárias têxteis, em geral, são ricas em sulfatos, adicionados em banhos de tingimento ou formados pela oxidação de espécies de enxofre mais reduzidas introduzidas nos processos de coloração. As BRS podem, então, desempenhar um papel significativo durante processos anaeróbios, seja na competição por elétrons na oxidação de matéria orgânica, como na geração de sulfetos, através da redução de sulfatos (SARAYU; SANDHYA, 2012; VAN DER ZEE et al., 2003). Assim, é esperado que ocorram atividades químicas simultaneamente às biológicas na degradação de corantes em condições anaeróbias ou microaerofílicas (DOS SANTOS et al., 2006; VAN DER ZEE, 2002).

Apesar do nome, BRS também podem usar outros aceptores de elétrons para seu crescimento além do sulfato¹⁵. A ocorrência e manutenção desse tipo de bactéria em grande número não estão, portanto, necessariamente condicionadas à existência de sulfato e sua

¹⁴ Apesar do nome, membros dos domínios *Bacteria* e *Archaea* conseguem usar o sulfato como aceptor de elétrons terminal. Alguns pesquisadores usam então o termo procariontes redutores de sulfato ou microrganismos redutores de sulfato (MUYZER; STAMS, 2008)

¹⁵ Este grupo também pode reduzir outros compostos a base de enxofre a sulfeto ou reduzir nitrato e nitrito a amônia.

redução no meio, embora esta seja a ocorrência mais comum. Não obstante, essas bactérias são capazes de proliferar-se em diferentes condições ambientais, sendo abundantes em ambientes hipersalinos, sob condições saturadas de oxigênio e também detectáveis em amplas faixas de pH¹⁶ (MUYZER; STAMS, 2008). A literatura as classifica em grupos: (a) que promovem degradação incompleta de compostos orgânicos a acetato e (b) que promovem degradação completa a dióxido de carbono (MUYZER; STAMS, 2008). A redução de sulfato a sulfeto por BRS ocorrerá desde que haja quantidade de matéria orgânica suficiente para promover a redução completa. Assim, pelo cálculo estequiométrico, a relação DQO/Sulfato mínima esperada para que a conversão completa ocorra é de 0,67 (CAMILOTI et al., 2014; HU et al., 2015).

Sulfetos podem estar distribuídos em várias formas nas águas residuárias (S^{2-} , HS^- , H_2S), a depender de equilíbrios físico-químicos (Figura 5). A formação desses compostos é vista como um grande problema no tratamento anaeróbio em águas residuárias ricas em sulfato, uma vez que, na forma de sulfeto de hidrogênio (H_2S), é responsável por causar corrosão, toxicidade e fortes odores. A alta concentração desse composto pode chegar a ser tóxica inclusive a BRS. Buscando minimizar a formação destes compostos em águas residuárias, estudos sobre mudanças operacionais visando este objetivo já foram realizados, porém, sem sucesso (HU et al., 2015; MUYZER; STAMS, 2008). O direcionamento para oxidação do sulfeto nos processos de descoloração pode, portanto, mitigar os problemas oriundos desse composto em sistemas de tratamento anaeróbio, aprimorar a remoção de cor de corantes azo e contribuir com a alcalinidade do sistema em condições microaerofílicas com a conversão do sulfeto a enxofre elementar e formação do ânion OH^- (MUYZER; STAMS, 2008). Espécies oxidadas de enxofre (S^0 e polissulfetos) podem ser novamente convertidas a bissulfetos ao realizar a incubação anaeróbia da mistura junto com lodo anaeróbio e doador de elétrons adequado e reaproveitadas (CERVANTES et al., 2007).

¹⁶ Encontradas em locais de drenagem ácida de minas com pH chegando a 2, e lagos alcalinos onde o pH pode chegar a 11.

Figura 5 - Formas de espécies de sulfeto em meio aquoso e sua prevalência relativa de acordo com o valor do pH.

Fonte: House e Weiss (2014).

3.7.5. Rotas reacionais

Dos Santos et al. (2007) observaram que bactérias fermentativas e arqueias metanogênicas também podem ter participação na redução de corantes azo. O nível de influência está relacionado à presença de mediadores redox, que são capazes de maximizar o processo de descolorização ao permitir a participação mais efetiva de alguns grupos de bactérias que são comumente encontrados em sistemas de tratamento de águas residuárias.

A Figura 6 resume os métodos como pode ocorrer a descoloração redutiva em ambientes anaeróbios comentados até aqui: a) por transferência direta dos elétrons para os corantes azo que agem como aceptores finais através de enzimas, durante o catabolismo bacteriano ligado à geração de ATP; b) pela redução química direta através de redutores biogênicos resultantes de diferentes processos metabólicos ou; c) pela redução livre e indireta dos corantes azo pelos produtos finais do catabolismo bacteriano que atuam como mediadores redox de baixo peso molecular independentes da produção de ATP, catalisando a cinética de reação (GURULAKSHMI; SUDAR; VENBA, 2008; SINGH; SINGH; SINGH, 2015). Todas as rotas descritas na Figura 6 levam à formação de subprodutos de degradação dos corantes azo conhecidas como aminas aromáticas, assunto abordado no próximo tópico.

Figura 6 - Métodos de degradação de corantes azo. DE= doador de elétrons; RM = Mediador Redox; b = Bactéria

Fonte: Adaptado de Singh et al. (2015).

3.8. Mineralização incompleta: Aminas aromáticas

Os diferentes tipos de enzimas, quebras (oxidativa e redutiva), mediadores redox e outros compostos inorgânicos geram produtos de degradação imprevisíveis. A aleatoriedade do processo de quebra resultante destes fatores é observada pela ocorrência das possíveis quebras simétricas e assimétricas de ligações azo, que resultam em diferentes produtos intermediários e finais. O processo redutivo anaeróbico de quebra simétrica das ligações azo é sucedido pela degradação incompleta dos subprodutos, que culmina na formação de soluções incolores compostas, entre outros metabólitos, por aminas aromáticas. As aminas aromáticas são compostos químicos que se caracterizam por possuir um ou mais anéis aromáticos ligados a substituintes do grupo amina em sua estrutura molecular. Possuem elevado teor de toxicidade e são recalcitrantes sob condições anaeróbicas (ÖZKAN et al., 2019; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004). Os grupos tóxicos na estrutura do corante e as condições ambientais controlam o nível de toxicidade dos subprodutos de compostos azo que serão formados.

Estes compostos podem causar problemas à saúde como náuseas, hemorragia, ulceração da pele, membranas mucosas, danos aos rins, sistema reprodutivo, fígado, cérebro e sistema nervoso central (SARAYU; SANDHYA, 2012). A União Europeia já tem uma relação de 24 metabólitos (aminas aromáticas) considerados tóxicos e proibiu seu uso em indústrias (RAWAT; MISHRA; SHARMA, 2016). Por essa razão, a descoloração redutiva significa apenas a primeira etapa no tratamento destes corantes. É necessário que estes produtos intermediários sejam ainda degradados para formas inócuas, antes do lançamento final do

efluente (GURULAKSHMI; SUDAR; VENBA, 2008; VAN DER ZEE; VILLAYERDE, 2005).

Há elevada percentagem das aminas aromáticas com conhecido impacto relevante sobre o meio ambiente que já têm sua biodegradabilidade comprovada. Todavia, esta condição é dependente da população microbiana e sua capacidade adaptativa, além da disponibilidade de oxigênio no meio, uma vez que são suscetíveis à oxigenase (VAN DER ZEE; VILLAYERDE, 2005). Pinheiro et al. (2004) e Van der Zee e Villaverde (2005) relatam sobre diversos trabalhos com compostos substituídos de amina que são aerobiamente degradáveis. Por isso, a configuração mais recomendada para estações de tratamento biológico de efluentes com vistas à mineralização total dos corantes azo é composta por um tratamento sequencial anaeróbio-aeróbio (AMARAL et al., 2017; FERRAZ et al., 2011; FRANCISCON et al., 2009; JONSTRUP et al., 2011; MURALI et al., 2013; VAN DER ZEE; VILLAYERDE, 2005). Estes estudos, porém, não revelam qual é o exato mecanismo atuante na degradação desses subprodutos, seja biodegradação, adsorção ou reações químicas, embora haja indicações de auto-oxidação de aminas durante o tratamento aeróbio. Como a degradação das aminas exige microrganismos específicos, a biomassa presente pode ter um papel determinante na remoção desses compostos (VAN DER ZEE; VILLAYERDE, 2005).

3.9. Crescimento de biomassa

Os reatores anaeróbios contínuos são categorizados com relação à sua configuração de cultivo em dois tipos: culturas suspensas e culturas aderidas. Culturas suspensas precisam de certo grau de mistura dentro do reator que impeça a sedimentação da biomassa e facilite o contato entre microrganismos anaeróbios, enzimas e matéria orgânica presentes na mistura (MOSTAFA et al., 2017). Por outro lado a imobilização da biomassa pode ocorrer pela adesão a superfícies (biofilme) ou a outros microrganismos por auto-adesão ou, ainda, por ligações químicas formando grânulos (RODRÍGUEZ COUTO, 2009). As culturas imobilizadas são mais resilientes a perturbações ambientais como pH, potencial redox e materiais tóxicos em relação às culturas suspensas já que o elevado período de retenção celular com baixo período de detenção hidráulica pode aumentar a tolerância da biomassa à compostos inibidores (SARAYU; SANDHYA, 2012).

A imobilização de um consórcio bacteriano, apropriadamente balanceado ao objetivo desejado, facilita as reações sinérgicas de conversão que ocorrem na digestão anaeróbia e atenua o efeito de elevadas concentrações de produtos intermediários, além de fatores

ambientais, permitindo maior estabilidade operacional em relação a sistemas livres (G. LETTINGA, 1995; KHAN; BAANERJEE, 2010). A imobilização geralmente aumenta a estabilidade das enzimas, pois, elas ficam menos expostas a compostos inibidores e elevadas concentrações de recalcitrantes orgânicos tóxicos. Estudos apontam que há uma relação positiva entre o tempo de detenção hidráulica na etapa anaeróbia e a eficiência de remoção de cor (FRANCISCON et al., 2009; LU; LIU, 2010; VAN DER ZEE; VILLAVARDE, 2005). Zille, Tzanov e Gubitz (2004), entretanto, alertam em seu trabalho para uma possível menor acessibilidade do sistema enzimático para interação com corantes aniônicos devido à imobilização da biomassa em matriz alumina, diminuindo a estabilidade do sistema na remoção de cor.

3.9.1. Material Suporte: Métodos de imobilização e difusividade

Existem diversos métodos para imobilização de células bacterianas. A maior parte desses métodos pode ser agrupada em 4 categorias principais: (1) aprisionamento matricial, (2) microencapsulamento, (3) adsorção e (4) ligação covalente. A seleção correta das condições ambientais prevalentes permite a estabilização e concentração de biomassa concentrada e menor geração de lodo biológico (KHAN; BAANERJEE, 2010). As células bacterianas conseguem firmar-se em quase toda superfície submersa em ambiente aquático. Durante seu crescimento, elas produzem polímeros extracelulares formando uma matriz entrelaçada que conhecemos como o biofilme. Os principais critérios para seleção de material suporte na descoloração são: velocidade reacional e menor quantidade de material celular desprendido do biofilme durante a reação (MARCHANT, 1995).

A depender do material suporte empregado, os compostos no reator passam por diferentes perfis de difusividade da massa líquida até o biofilme enquanto as reações bioquímicas ocorrem. A Figura 7 ilustra um padrão qualitativo dos perfis de concentração no transporte de massa de um composto corante genérico do meio líquido até o núcleo de ação biológica em três situações distintas: (a) Crescimento do biofilme em material impermeável, (b) agregação celular com células aprisionadas e (c) crescimento do biofilme em material poroso.

Figura 7 - Perfis de difusividade de corante a partir da massa líquida até a fase biológica. (a) Biofilme em partícula impermeável; (b) Agregado celular; (c) Biofilme em partícula porosa. q_p : Concentração do corante na fase sólida.

Fonte: Adaptado de Olivieri et al. (2010).

A queda de concentração do corante que começa da massa líquida até o centro da fase biológica é regida pela competição entre o transporte do composto, bioconversão e adsorção. É possível observar, entre as situações (a) e (b), o perfil se estender ao centro da partícula no caso (b), diferente do material impermeável em (a). O perfil (c) mostra uma descontinuidade na superfície do material poroso, o que mostra que o biofilme que cresce dentro de partículas como neste caso é diferente de biofilmes que crescem na superfície ao redor das partículas (OLIVIERI; DONATO; MARZOCHELLA, 2010).

A modelagem de reatores com biofilme deve levar em consideração o equilíbrio dinâmico entre o crescimento e desprendimento simultâneo de biomassa. O desprendimento da biomassa pode ocorrer por fatores diversos como erosão por cisalhamento, remoção de pedaços maiores de biomassa e abrasividade, com taxas relativas às condições operacionais. O desprendimento das células do biofilme pode contribuir com a participação das células livres, ainda que sob condições de “lavagem”. A fase suspensa produzida pela biomassa desprendida pode resultar numa carga de microrganismos semelhante à biomassa aderida (OLIVIERI; DONATO; MARZOCHELLA, 2010). Considerando as possibilidades existentes, a literatura reúne resultados em diversos trabalhos onde são realizadas análises comparativas entre culturas suspensas e aderidas em processos de remoção de cor.

3.9.2. Crescimento Suspenso x Crescimento Aderido

Harb et al. (2015), em seu estudo sobre diferenças em comunidades microbianas em biorreatores de membranas, compararam as configurações de cultivo e observou maior produção de metano em reator de mistura completa, em relação ao de crescimento aderido. O

estudo também relata sobre o favorecimento da proliferação de populações específicas do processo de digestão anaeróbia, a depender do tipo de cultivo da biomassa no reator.

Mohan et al. (2013) observaram as diferenças de desempenho das configurações de reatores em batelada de crescimento aderido e suspenso no tratamento do corante azo *Acid Black 10B*. Os resultados mostraram que o aumento gradativo da concentração do corante resultou no aumento da eficiência em ambas as configurações, com remoção máxima de cor dentro das primeiras 6 horas dos ciclos de operação. As configurações mostraram tendência similar nos padrões de remoção conforme modificações foram realizadas.

A relação Corante/DQO mostrou exercer influências distintas sobre remoção de corante e DQO. Com o aumento da concentração do corante, ambos os sistemas exibiram incremento na remoção de corante, com melhor desempenho no reator de crescimento aderido. Por outro lado, com relação à remoção de DQO, o sistema suspenso apresentou maior eficiência em relação ao sistema de biofilme.

Saba et al. (2013) estudaram a descoloração do corante azo *Reactive Black-5* em reatores sequenciais em batelada (SBR¹⁷) com crescimento suspenso e aderido utilizando diferentes cossustratos com diferentes combinações de lodo, cultura e corante. Os autores observaram remoção de 85% de DQO e 96% de remoção de cor no reator de crescimento aderido, somente devido à degradação microbiana. Nos reatores de crescimento suspenso houve 88% de remoção de cor e 84% em remoção de DQO.

Senan e Abraham (2004) desenvolveram um consórcio bacteriano aeróbio, sob meio suporte mineral, que descoloriu um efluente têxtil misto com sete espécies comerciais de corantes azo, convertendo-os a compostos de baixo peso molecular e ausente de aminas.

Van der Zee, Lettinga e Field (2001) verificaram a descoloração de uma mistura de 20 corantes azo por lodo granular de um reator *UASB* e observaram o aumento da taxa de degradação das estruturas azo sem ocorrência de fase lag, com taxas de descoloração independentes do peso molecular do corante, indicando que a permeabilidade celular teve pouca relevância na redução. Tais evidências apontaram para um possível mecanismo de reação extracelular não enzimática envolvendo compostos reduzidos, além de evidências da atuação direta de reduções químicas dos corantes azo pela presença elevada de sulfetos no meio. A biomassa anaeróbia é apontada como benéfica ao processo por manter as pequenas concentrações destes compostos reduzidos e evitar inibição.

¹⁷ Sequencing Batch Reactor

Estudos recentes descrevem um novo tipo de biorreator anaeróbio com leito fixo estruturado, projetado para evitar a colmatagem do leito do reator e impedir acúmulo de sólidos suspensos em seu interior, diminuindo assim as obstruções e aumentando seu volume útil além do aumento de concentração de biomassa sem aumento de sólidos no efluente. O conceito é baseado na utilização de um leito fixo estruturado como uma matriz de imobilização para a biomassa anaeróbia. O meio suporte consiste de espuma de poliuretano, um material com alta área superficial, quimicamente inerte e de fácil incorporação ao reator (CAMILOTI et al., 2014; MOCKAITIS et al., 2014). Camiloti et al. (2014) observaram, com esta configuração de reator (com 17 feixes de espuma de poliuretano como meio suporte), o desenvolvimento e estabilidade do biofilme e do processo, com eficiência satisfatória na remoção de sulfatos e matéria orgânica. O efluente do reator apresentou pequenas quantidades de sólidos, indicando grande adesão da biomassa ao biofilme.

Mockaitis et al. (2014), fazendo uso da mesma configuração de reator para um tratar efluente doméstico sintético, conseguiram atingir estabilidade na operação em um período experimental de 36 dias. O reator atingiu seu limite de eficiência de remoção de matéria orgânica na condição estudada com um TDH de 3 horas, considerando que a configuração inicial do reator seria de 12 horas. Vale mencionar que, devido à natureza do material deste meio suporte, é possível que ocorra adsorção do corante no meio suporte colaborando para a remoção de cor. A influência deste fenômeno pode variar de acordo com o pH do meio.

Oliveira (2019) obteve um consórcio microbiano a partir de solo e resíduos lignocelulósicos em decomposição adaptado ao corante *Direct Black 22*, que mostrou ser capaz de realizar a descoloração do mesmo em um período de até 12 horas. O resultado foi obtido através da realização de ensaios em batelada à temperatura de 30 °C, sem agitação, sob períodos de aeração intermitentes. Entretanto, não foi avaliado qual o tipo de cultivo em que melhor se desenvolve a biomassa adaptada para produzir melhores resultados sob operação contínua. Este é o objetivo principal ao qual este trabalho se dispõe a avaliar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências Laboratório de Processos Biológicos (LPB), localizado no Campus II da Universidade de São Paulo em São Carlos. O aparato experimental consistiu de dois reatores contínuos de fluxo ascendente, inoculados com biomassa obtida de reator anaeróbio alimentado com efluente têxtil sintético contendo o corante *Direct Black 22*. Durante o experimento, foram mantidas as mesmas condições ambientais do reator que deu origem ao inóculo. Os reatores diferem na estrutura interna para suporte e crescimento da biomassa, sendo um deles composto por leito fixo estruturado de espumas de poliuretano (RA) e o outro de crescimento de biomassa em suspensão (RS), portanto sem suporte fixo.

O padrão de escoamento nos reatores foi previamente avaliado por meio de ensaios hidrodinâmicos. Em seguida, os reatores foram inoculados e operados por um período aproximado de 6 meses (167 dias), dividido em quatro períodos de operação, caracterizados por diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH). O tempo de detenção foi reduzido em 6 horas, a cada novo período. Os principais parâmetros-resposta avaliados em cada um dos períodos foram: eficiências de remoção de cor e de demanda química de oxigênio (DQO), eficiência de remoção de sulfato e concentração de sulfeto dissolvido no efluente dos biorreatores. A produção de gases nos reatores também foi monitorada. Ao final de cada período, coletou-se uma amostra do biofilme de cada um dos reatores para análise de biologia molecular por meio da técnica de *DGGE*; com o objetivo de comparar as populações microbianas entre os diferentes períodos.

4.1. Inóculo

4.1.1. Ativação da Biomassa

Os microrganismos utilizados foram originalmente coletados a partir de material lignocelulósico – cascas de madeira e solo – em estudo desenvolvido por Oliveira (2019) fazendo uso do corante *Direct Black 22*. A motivação para o uso desse inóculo leva em consideração o potencial dos microrganismos produtores de enzimas modificadoras da lignina na biodegradação de corantes azo, devido à semelhança estrutural dos corantes azo com a lignina (FORSS; WELANDER, 2009, 2011; HAN et al., 2014; SENAN; ABRAHAM, 2004).

Os microrganismos encontravam-se preservados em solução contendo 50% glicerina ($v.v^{-1}$) e 50% com meio de cultura (MC)¹⁸ ($v.v^{-1}$) de pH 9,6, distribuídos em alíquotas de 2mL. As alíquotas foram colocadas em tubos de *ependorf* e armazenadas sob temperatura de -80 °C em congelador de ultra-baixa temperatura¹⁹. Para recuperação da atividade de descoloração do corante azo da biomassa na descoloração do corante azo, uma alíquota de 4mL foi descongelada à temperatura ambiente e transferida para 100mL de solução de MC recém preparada, desta vez também contendo 32,5 $mg.L^{-1}$ do corante DB22 para promover a sua adaptação. A solução foi armazenada em câmara escura à temperatura de 30 °C até que se observasse nível perceptível de descoloração na solução.

Figura 8 - Meio de cultura com corante inoculado antes (esq.) e depois (dir.) da descoloração.

Fonte: Autor.

Os microrganismos recuperaram atividade metabólica rapidamente com a descoloração sendo nítida em torno de 72 horas após a inserção na solução com meio de MC.

4.1.2. Reprodução do inóculo

Após ativação, a biomassa contida na solução descolorida foi multiplicada para que o material celular fosse suficiente para inoculação dos reatores. Para isso, o MC fermentado foi centrifugado a 9.000 rpm por 5 minutos para recuperação da biomassa e descarte do sobrenadante. O pellet formado foi lavado com solução de NaCl (0,9%) ($m.v^{-1}$) para remoção de metabólitos, e novamente centrifugado para descarte do sobrenadante. A biomassa foi

¹⁸ Composição do meio de cultura: Glicose ($C_6H_{12}O_6$) ($30g.L^{-1}$), extrato de levedura ($6g.L^{-1}$), KH_2PO_4 ($6g.L^{-1}$) e Na_2CO_3 ($10g.L^{-1}$). Adaptado de Senan e Abraham (2004).

¹⁹ Congelador ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA.

inserida em um frasco contendo novo MC fresco com corante e incubado, sem agitação, em uma câmara de temperatura controlada a 30 °C. Esse procedimento permitiu a cultura de microrganismos se multiplicasse sob a mesma concentração de corante, de maneira a desenvolver aqueles que fossem capazes de promover a descoloração.

O material produzido foi transferido para novos volumes com maiores diluições de MC com corante na medida em que a descoloração completa ocorria para enriquecimento da cultura de microrganismos degradadores de azo. A produção média de biomassa no meio de cultura durante a etapa de bioaugmentação, em termos de sólidos totais (ST), foi de 27,024 g-ST.L⁻¹.

4.2. Efluente têxtil sintético

4.2.1. Solução estoque de corante

O C.I. *Direct Black 22* C.I. 35435 (DB22; CAS 6473-13-8) foi concedido por uma indústria no município de Caruaru – PE (Figura 2). O composto possui peso molecular de 1083,97 g.mol⁻¹ e pureza de ~50% e é utilizado principalmente na indústria têxtil, papel e couro. Sua estrutura conta com quatro ligações azo e três grupos sulfonados que atuam para conferir maior solubilidade ao corante em meio aquoso.

Para condução do experimento, foi preparada uma solução estoque do corante com concentração de 5 g.L⁻¹. Para aumentar a solubilidade do corante em água e simular sua condição comum em efluentes têxteis reais, a solução preparada foi submetida a um processo de hidrólise descrita por dos Santos et al. (2003). O método consiste em elevar o pH da solução até 11 com adição de NaOH (conc. 50% m.m⁻¹), e então mantê-lo sob uma temperatura de 80-85 °C, sob agitação, durante o período de uma hora. Após esse tempo, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e o seu pH diminuído ao pH 7 com a adição de HCl (6 N). O processo de hidrólise produz alterações nas propriedades químicas da molécula de corante, substituindo grupos da molécula original, podendo leva-los a gerar compostos mais tóxicos após a quebra da ligação azo (GOTTLIEB et al., 2003). A solução estoque foi então armazenada em frasco âmbar envolto com papel alumínio para proteção contra degradação luminosa, em temperatura ambiente, para o posterior uso no preparo do efluente têxtil sintético. A mesma solução foi utilizada durante a etapa de ativação e reprodução do inóculo. Antes de passar pelo processo de hidrólise, o pH da solução de corante situava-se em torno de 9,5.

4.2.2. Composição da água residuária

A água residuária (AR) têxtil sintética foi elaborada buscando obter os compostos comumente encontrados em águas residuárias têxteis reais (AMARAL et al., 2017; AMORIM et al., 2013; FERRAZ et al., 2011). A mistura consistiu, basicamente, de corante, fonte de cossustrato e solução de macro e micronutrientes. Para evitar limitações com relação ao uso do substrato, a glicose foi escolhida neste trabalho como fonte de cossustrato devido à sua rápida assimilação. Esse substrato é extensamente reportado na literatura, sendo, inclusive, a melhor fonte de cossustrato avaliado no trabalho de Mohana et al. (2008) acerca da descoloração do corante *DB22*. A concentração do corante foi de 0,03mM, semelhante ao que fora realizado por Florêncio (2018) e Oliveira (2019). Adicionou-se Na_2SO_4 como fonte de sulfato, visto que sais de sulfato são comumente presentes nos efluentes (BISSCHOPS; SPANJERS, 2003; VAN DER ZEE et al., 2003). A concentração final de sulfatos no afluente foi de, aproximadamente $338 \text{ mgSO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$.

A disponibilidade de nitrogênio tem efeito estimulante no crescimento celular e, consequentemente, na descoloração reductiva. Para prover este nutriente, diversos estudos apontam para o extrato de levedura como uma das melhores fontes (BARDI; MARZONA, 2010; CHEN et al., 2003; GUADIE et al., 2017; MOHANA et al., 2008). Em testes preliminares, as maiores taxas de descoloração do *DB22* pelo consórcio desenvolvido foram observadas em valores de pH mais alcalinos. Esta observação pode gerar vantagens ao tratamento comercial, uma vez que as águas residuárias têxteis podem vir a ser altamente alcalinas. Como fonte de alcalinidade, adicionou-se carbonato de sódio (Na_2CO_3). O pH alcalino resultante visou restringir a ocorrência de fenômenos como a metanogênese (favorecida em pH próximo à neutralidade), buscando a predominância da atividade de microrganismos acidogênicos capazes de remover cor. Considerando o teor de sais que são comumente usados como aditivos nos processos têxteis, foi adicionado também NaCl. Demais reagentes foram adicionados para viabilizar o crescimento celular com base em outros estudos sobre efluentes têxteis (DAI et al., 2018; HUANG et al., 2015; SENAN; ABRAHAM, 2004; VAN DER ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001).

Feitas estas considerações, a composição da água residuária utilizada no experimento continha: *DB22* ($32,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), glicose ($1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), Na_2SO_4 ($0,50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e NaCl ($0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e Na_2CO_3 ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Os elementos traços foram fornecidos pela adição de uma alíquota de $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ com a seguinte composição ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,75), $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(0,5), H_3BO_3 (0,1), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,05), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,005), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,004) e EDTA (1,0). Todos os reagentes utilizados possuem padrão analítico. As Tabelas 4 e 5 a seguir resumem as concentrações aplicadas a cada um dos compostos do efluente em termos de macro e micronutrientes.

Tabela 4 - Composição do efluente têxtil sintético com corante e cossustrato e macronutrientes.

Constituinte	Concentração (mg.L ⁻¹)
DB22	32,5
C₆H₁₂O₆	1000
KH₂PO₄	250
Na₂SO₄	500
MgSO₄·7H₂O	100
NaCl	500
Extrato de levedura	200
Na₂CO₃	2000

Fonte: Autor

Tabela 5 - Composição da solução estoque de micronutrientes ao adicionada ao efluente têxtil sintético a 1mL.L⁻¹.

Constituinte	Concentração (g.L ⁻¹)
FeSO₄·7H₂O	0,75
NiSO₄·7H₂O	0,5
MnCl₂·4H₂O	0,5
ZnSO₄·7H₂O	0,5
H₃BO₃	0,1
CoCl₂·6H₂O	0,05
CuSO₄·5H₂O	0,005
Na₂MoO₄·2H₂O	0,004
EDTA	1

Fonte: Autor.

Como o sistema de alimentação não passou por autoclavagem, para minimizar o efeito de acidificação da água residuária pelo crescimento microbiano, o frasco de alimentação era armazenado em ambiente refrigerado a 4 °C.

4.3. Sistema experimental

4.3.1 Estrutura dos reatores

Para execução do experimento, foram utilizados dois reatores biológicos construídos em acrílico transparente. O primeiro reator é de leito estruturado (RA), formado por base cônica (diâmetro interno = 8,2 cm e comprimento = 7,5 cm), destinada à retenção do excesso de biomassa; corpo cilíndrico de mesmo diâmetro (comprimento = 32,5 cm), *headspace* (comprimento = 11 cm), com volume útil de 2,20 L (base cônica e corpo cilíndrico somados) (CAMILOTI et al., 2014).

O segundo reator anaeróbico visa, com sua estrutura, apenas o crescimento de biomassa livre suspensa (RS). Com dimensões idênticas às do RA na base cônica, seu *headspace* tem 30 cm e saída lateral em ‘Y’ com inclinação de 45° com a horizontal, que permite a sedimentação de sólidos antes do descarte. Este artifício viabiliza a permanência de biomassa e evitando o arraste do material celular junto com o efluente. O braço lateral é móvel, permitindo ajuste de altura para controle de volume do *headspace* (HAANDEL; LETTINGA; GATZE, 1994). O volume útil do reator é de 3,31 L.

Ambos os reatores foram instalados no interior de uma câmara, para evitar exposição à luminosidade e manter o controle da temperatura de operação (30 °C). A Figura 9 mostra modelos dos reatores com suas respectivas dimensões.

Figura 9 - Modelos dos reatores. (A) Reator com meio suporte. (B) Reator de crescimento suspenso. (C) Corte do reator ‘A’ (D) Corte do reator ‘B’.

Fonte: Autor.

4.3.2 Suporte de imobilização de biomassa

O meio suporte da biomassa no reator anaeróbio de leito estruturado (RA) foi composto por tiras de espuma de poliuretano fixas, alocadas ao longo do perfil do reator (CAMILOTI et al., 2014; MOCKAITIS et al., 2013). As hastes de poliuretano foram colocadas revestindo fios de aço de comprimento idêntico ao do corpo cilíndrico do reator, para que se sustentassem no interior do reator. A espuma de poliuretano foi escolhida como material suporte dada sua elevada área superficial, propriedades químicas inertes além da fácil obtenção e montagem no reator (MOCKAITIS et al., 2014).

4.3.3 Ensaios hidrodinâmicos

Realizou-se um estudo hidrodinâmico para a determinação do padrão de escoamento nos reatores antes do início da operação. Os reatores já estavam na condição em que seriam operados, com o RA já com o meio suporte montado em seu interior. O experimento consistiu na alimentação de traçador (NaCl) em ensaios do tipo degrau, com TDH nominal de 24h em ambos os reatores (LEVENSPIEL, 1980).

Os reatores foram preenchidos com água de abastecimento e tiveram sua vazão ajustada ao TDH já mencionado. Uma sonda de condutividade *Vernier COM-BTA* foi instalada na saída do reator, acoplada a uma interface *USB Go!Link (Vernier Software & Technology)* conectada a um computador, onde os dados foram captados através do software *Logger Lite 1.6.1 (Vernier Software & Technology)*. A sonda foi calibrada tendo como valores de referência a concentração de sal da água de abastecimento (0) e uma solução salina de cloreto de sódio (NaCl), em água de abastecimento, de 10 g.L⁻¹ (10.000).

O ensaio teve início com a substituição da alimentação de água de abastecimento pela solução salina e foi mantida por um período de tempo equivalente a três vezes o TDH nominal (72 horas). Durante esse período, a concentração de NaCl na corrente efluente foi monitorada pela sonda instalada, registrando os valores a cada minuto. Com estes valores, foi possível obter as curvas de distribuição do tempo de residência em cada um dos reatores, tempo de retenção hidráulica médio real e ajuste ao modelo de escoamento de N reatores de mistura completa em série.

O tratamento dos dados foi realizado através do software *OriginPro 8®*, segundo o método de Levenspiel (1980). O perfil temporal de concentração de NaCl (Curva C) foi normalizado para obter a curva F da maneira descrita na equação a seguir:

$$F(t) = \frac{c(t)}{c^*} \quad (1)$$

Onde $C(t)$ é a concentração do sal durante o tempo e C^* é a concentração máxima de sal registrada durante todo o monitoramento do ensaio, que deve coincidir com a concentração de NaCl presente na alimentação (10g.L^{-1}).

A curva F resultante foi ajustada por interpolação utilizando o método *SPLine* a fim corrigir desvios nas flutuações de concentração do sal que não afetassem o resultado. Para obter o tempo de detenção hidráulica médio ($\bar{\theta}_h$), a integral discretizada apresentada na equação a seguir foi calculada:

$$\bar{\theta}_h = \frac{\int_0^\infty t \cdot E(t) \cdot dt}{\int_0^\infty E(t) \cdot dt} \cong \frac{\sum_0^n t \cdot E(t) \cdot \Delta t}{\sum_0^n E(t) \cdot \Delta t} \quad (2)$$

Sendo n o número de dados captados durante o ensaio, $E(t)$ a curva de distribuição do tempo de residência (DTR) ($\text{dF} \cdot \text{dt}^{-1}$) e t um valor de tempo.

O número de reatores de mistura completa sequenciais que é equivalente ao escoamento que fora observado (N) foi calculado pela equação que segue:

$$N = \frac{\bar{\theta}_h^2}{\sigma^2} \cong \bar{\theta}_h^2 \cdot \frac{\sum_0^n E(t) \cdot \Delta t}{\sum_0^n (t - \bar{\theta}_h)^2 \cdot E(t) \cdot \Delta t} \quad (3)$$

Onde σ^2 representa a variância da curva de distribuição do tempo de detenção nos reatores.

Ao fim do ensaio, os reatores foram esvaziados e lavados com água de abastecimento para remoção do sal residual nas paredes e espuma de poliuretano.

4.3.4 Inoculação

Para realizar a inoculação, o MCC²⁰ fermentado com a biomassa especializada já ativada foi diluído junto com o efluente sintético dentro do reator, ocupando cerca de 50% em volume em cada um. O efluente sintético preparado passou a ser bombeado para o reator com TDH de 72 horas para que a comunidade microbiana se estabelecesse no meio sem que houvesse a lavagem da biomassa. As análises dos parâmetros estudados foram feitas rotineiramente, três vezes por semana para acompanhar os níveis de remoção de cor e estabilidade.

²⁰ Meio de cultura com corante

Figura 10 - Imagens dos reatores RA e RS recém inoculados com meio fermentado.

Fonte: Autor.

Os reatores permaneceram sob período de inoculação durante 30 dias para estabelecimento da comunidade microbiana. Após isto, o TDH foi reajustado gradativamente para 24 horas para evitar o choque do aumento de carga e teve, assim, início o primeiro período de operação (PI). Os períodos seguintes seguiram um padrão de diminuição gradativa do TDH, sendo mantida a diferença de 6 horas do período anterior. Assim, os períodos foram caracterizados por TDH de 24, 18, 12 e 6 horas, mantendo-se constantes todas as demais condições. Os valores de carga orgânica volumétrica (COV) e de carga volumétrica de corante (CVC) nos reatores, durante os diferentes períodos, são apresentados a seguir:

Tabela 6 - Variação de carga orgânica e de corante durante os períodos de operação nos reatores.

Período	TDH	Carga Orgânica Volumétrica (COV) (kgDBO/m ³ .d)	Carga volumétrica de corante (CVC) (gDB22/m ³ .dia)
1	24	1,2	32,5
2	18	1,6	43,3
3	12	2,4	65,0
4	6	4,8	130,0

Fonte: Autor.

4.4. Métodos analíticos

Para realizar o monitoramento dos reatores, os seguintes parâmetros foram avaliados periodicamente: Demanda química de oxigênio (DQO), pH, condutividade elétrica, sólidos totais e sólidos suspensos voláteis (SSV) utilizando as metodologias descritas no manual *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2005). Após o primeiro período operacional, a concentração de carboidratos totais, representado pelos

açúcares totais no afluente, também passou a ser medida para avaliar a possível degradação do cossustrato (glicose) no tanque de alimentação. Com isso, pôde-se verificar efeitos da redução na concentração de glicose na descoloração reductiva. A determinação foi realizada pelo método fenol-sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956).

Ácidos orgânicos voláteis (AOV) foram obtidos por cromatografia gasosa de alta performance pelo equipamento GC-2010²¹ equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna HP-INNOWAX (comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm), segundo a metodologia do *headspace* automático de Adorno et al. (2014). As amostras foram previamente filtradas em membrana 0,22µm por filtro de seringa. A preparação da amostra para análise foi realizada conforme detalha a Tabela 7.

Tabela 7 - Composição da amostra para análise de ácidos em cromatografia gasosa.

Conteúdo	Quantidade	Unidade
Amostra	2	mL
Isobutanol	70	µL
Ácido crotônico	100	µL
Ácido sulfúrico – 2M	200	µL
NaCl	2	g

Fonte: Adorno et al (2014).

A cor foi medida por espectrofotometria com algumas adaptações no método descrito originalmente por Wu et al. (1998), enquanto que as aminas aromáticas foram qualitativamente avaliadas com base no estudo realizado por Pinheiro et al. (2004).

As concentrações afluente e efluente de sulfatos foram medidas pelo método turbidimétrico e sulfetos através do método espectrofotométrico descritos por APHA (2005), com o kit de análise de *HACH* para posterior leitura em espectrofotômetro *HACH DR-2500*. A produção teórica de sulfetos foi calculada com base no cálculo estequiométrico da Reação (4) de conversão autotrófica para comparação com o valor obtido nas amostras. Pelo cálculo realizado, observa-se que 96 mg de sulfato são necessários para produção de 33 mg de sulfetos (MUYZER; STAMS, 2008).

A medição de vazão dos reatores foi realizada diariamente pelo método volumétrico, coletando o volume de efluente gerado em períodos de 30 minutos em proveta. As análises de

²¹ Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA.

DQO, sulfato, cor e aminas aromáticas foram realizadas para amostras filtradas em filtros de seringa com membrana de fibra de vidro com diâmetro de 0,22 µm. O cálculo da eficiência percentual de remoção de DQO foi realizado pela equação:

$$\eta_{DQO} = \frac{DQO_{afl} - DQO_{efl}}{DQO_{afl}} \cdot 100\% \quad (5)$$

Onde η_{DQO} é a eficiência de remoção, DQO_{afl} é a concentração de DQO medida no tanque de alimentação e DQO_{efl} é a concentração de DQO efluente. Com os dados de DQO e vazão, foi calculada a carga orgânica volumétrica (COV) que era aplicada nos reatores. A DQO removida e efluente nos reatores podem ser definidas como mostram as reações a seguir (BERTOLINO et al., 2012; SPAGNI; CASU; GRILLI, 2012):

$$DQO_{remov} = DQO_{afl} - DQO_{efl} \quad (6)$$

$$DQO_{efl} = DQO_{AOV} + DQO_{STD} + DQO_{resid} \quad (7)$$

Onde DQO_{afl} e DQO_{efl} são valores de DQO de entrada e saída, respectivamente; DQO_{AOV} corresponde à DQO proveniente dos ácidos orgânicos voláteis; DQO_{STD} aos íons de sulfeto dissolvidos e; DQO_{resid} corresponde a quaisquer vestígios de glicose e metabólitos (aminas aromáticas) no sistema.

A fração de DQO que fora removida por via sulfetogênica foi calculada com base no estudo realizado por Lens et al. (1998) que menciona que 0,67g de DQO são consumidos para cada grama de sulfato que é reduzida de acordo com as equações a seguir:

$$DQO_{SO_4^{2-}}(mg.L^{-1}) = 0,67 \cdot SO_4^{2-}removido(mg \cdot L^{-1}) \quad (8)$$

Onde $DQO_{removida}$ é a quantidade total de DQO removida no reator ($mg.L^{-1}$), $DQO_{SO_4^{2-}}$ é a quantidade de DQO convertida por redução de sulfatos ($mg.L^{-1}$) e $SO_4^{2-}removido$ é o teor de sulfatos removidos ($mg.L^{-1}$). A Tabela 8 a seguir apresenta a frequência das análises realizadas semanalmente e a metodologia aplicada.

Tabela 8 - Frequência semanal de realização de análises de monitoramento

Parâmetro	Frequência	Referência
ST	3x	APHA (2012)
STV		
DQO		
SSV		
pH		
Condutividade elétrica	3x	Wu et al. (1998)
Cor		
Sulfatos		
Sulfetos		
Aminas Arom. Qualitativas		
AOV	3x	Pinheiro et al. (2004) Adorno; Hirasawa; Varesche (2014)
Vazão		

Fonte: Autor.

4.1. Análise da composição dos precipitados no lodo de fundo

Durante a operação, amostras de material precipitado de ambos os reatores foram coletadas e para posterior análise qualitativa de detecção de enxofre elementar. O procedimento analítico aplicado foi baseado no método Hart (1961) *apud* Godoi et al. (2019), que consiste na precipitação de enxofre coloidal por troca de solvente. Primeiramente é realizada a extração de enxofre coloidal em acetona e em seguida é redissolvido em água destilada, formando uma dispersão coloidal branco-azulada. A turbidez da dispersão formada é diretamente proporcional a concentração de enxofre elementar.

4.2. Avaliação de remoção de cor

A cor refletida pelo corante *DB22* registra uma leitura de absorbância (Abs) em todo o espectro visível, sem picos de intensidade nítidos em nenhum comprimento de onda específico. Dito isto, a avaliação de remoção de cor foi realizada levando em conta duas situações. Primeiramente, foi considerada a área da curva de absorbância do corante compreendida dentro do espectro visível²². Analogamente, a segunda avaliação levou em consideração apenas o

²² 350nm~750nm

ponto de maior absorbância do corante, como observado nos trabalhos de Van der Zee et al. (2003) e Mohana et al. (2008).

Ambas abordagens, de varredura do espectro visível e leitura no comprimento de onda de maior absorbância ($\lambda_{m\acute{a}x}$), foram realizadas no espectrofotômetro *Macherey-Nagel, NANOCOLOR UVVIS II*. Para padronizar a análise e evitar interferentes, as amostras foram filtradas e diluídas em solução tampão de fosfato (10,86 g.L⁻¹ NaH₂PO₄·2H₂O e 5,98 g.L⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O) com pH ajustado para 7,4. O valor do pH foi ajustado para que as leituras estivessem padronizadas com o mesmo valor aplicado em outros trabalhos (BATTAN; SHARMA, 2018; DOS SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2004; FIRMINO et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2013; YU et al., 2011). As amostras foram diluídas em (1:2) para o efluente e (1:5) no afluente para que não extrapolassem limites de detecção. Os valores de absorbância lidos foram multiplicados pelo fator de diluição das amostras. O percentual de cor removida em relação à concentração afluente é tal como mostra a equação:

$$\eta_{R484} = \left(1 - \frac{Abs_{efl}}{Abs_{afl}}\right) \cdot 100\% \quad (9)$$

Onde η_{R484} é a eficiência de remoção de cor de uma amostra efluente em relação ao afluente no comprimento de onda $\lambda_{m\acute{a}x} = 484\text{nm}$; Abs_{efl} e Abs_{afl} são as absorbâncias neste ponto das amostras efluente e afluente, respectivamente. Analogamente:

$$\eta_{Rvis} = \left(1 - \frac{\acute{A}rea_{efl}}{\acute{A}rea_{afl}}\right) \cdot 100\% \quad (10)$$

Onde η_{Rvis} é a eficiência de remoção de cor de uma amostra efluente em relação ao afluente em toda a área varrida dentro do espectro visível; $\acute{A}rea_{efl}$ e $\acute{A}rea_{afl}$ são as áreas do espectro visível efluente e afluente, respectivamente.

4.3. Aminas aromáticas qualitativas

Os subprodutos provenientes da degradação do corante *Direct Black 22* em ambiente anóxico foram monitorados de maneira qualitativa através da varredura de amostras realizada no espectrofotômetro *Macherey-Nagel, NANOCOLOR UV-VIS II*, na faixa ultravioleta (200-350nm)²³, para evitar interferências de cor. As amostras foram previamente centrifugadas a 9.000 rpm por 5 minutos. O método permite a análise de amostras diretas, podendo identificar a formação aminas aromáticas dentro do limite aplicado tal como é descrito por Pinheiro et al.

²³ Abaixo do nível visível

(2004). A análise foi feita pela sobreposição das curvas obtidas durante a varredura das amostras e análise de picos de absorvância pelo software *OriginPro 2018*.

4.4. Quantificação da biomassa aderida

Ao final da operação dos reatores foi realizada a quantificação média de biomassa aderida às hastes de poliuretano pelo método adaptado da metodologia descrita por Ribeiro (2001), em que são retirados cubos de espuma do reator para que seja separada a biomassa aderida e então, por pesagem, quantificada a biomassa por unidade de volume de espuma.

Inicialmente um volume de espuma foi selecionado, dividido e colocado em tubo *falcon* com 20mL de água destilada e pérolas de vidro. O tubo passou por agitação manual e por vórtex por cerca de 10 minutos. O procedimento com a espuma foi repetido até que não se percebesse desprendimento de material na água após o período de agitação. Em sequência, todo o líquido coletado com biomassa foi despejado em cápsula previamente calcinada e a espuma utilizada teve seu volume medido. A cápsula foi posta em estufa por 24 horas e, em seguida, pesada para obter o volume de sólidos totais (P1). Em seguida, a cápsula foi colocada na mufla a 550 °C para calcinação por 30 minutos para determinação da massa de sólidos voláteis (P2). O procedimento está sintetizado no fluxograma da Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma do procedimento experimental para a quantificação da biomassa aderida às matrizes de poliuretano.

Fonte: Adaptado de Ribeiro (2001).

Com os valores de P_1 (peso da biomassa aderida à espuma retirada) e P_2 (peso da biomassa descontando a presença dos sólidos voláteis) é possível obter os valores de sólidos totais por volume de espuma e sólidos voláteis por volume de espuma através das equações (11) e (12) a seguir:

$$ST = \frac{P_1}{Vol_{espuma}} \quad (11)$$

$$STV = \frac{(P_1 - P_2)}{Vol_{espuma}} \quad (12)$$

De posse do valor de massa específica da espuma de poliuretano previamente medida (0,022 g.cm⁻³), os resultados encontrados nas equações citadas puderam ser utilizados para definir a quantidade de biomassa por unidade de massa de espuma de poliuretano.

4.5. Análise de Biologia Molecular

Ao fim de cada um dos quatro períodos operados nos reatores, foram coletadas amostras de material celular livre, presente em RS, e, que havia crescido aderido às espumas de poliuretano em RA para análises microbiológicas. Estas análises tiveram por objetivo entender a dinâmica e diferenciação da comunidade microbiana no decorrer da operação dos reatores contínuos. A comparação das populações de bactérias presentes nas amostras avaliadas foi feita utilizando as técnicas de reação de cadeia polimerase (PCR) (NÜBEL et al., 1996) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; MUYZER; SMALLA, 2002).

4.5.1. Amostragem e Preservação

Para coleta das amostras, os reatores foram parcialmente esvaziados. Em RS, a abertura de uma das torneiras laterais causou despressurização do meio, provocando agitação na massa líquida que uniformizou o material disperso que foi sendo coletado pela torneira. Em RA, o *headspace* do reator foi desacoplado e uma das hastes de espuma de poliuretano foi removida e coletada para extração do material celular, com substituição imediata por uma nova haste de comprimento idêntico.

A amostra em RS foi centrifugada por 5 minutos a 9.000 RPM para separação do material celular do sobrenadante. Em RA, a espuma retirada foi repartida em pedaços menores que foram postos em tubos *falcon* de 50 mL com 25 mL de água destilada e uma quantidade esferas de vidro de massa aproximadamente 4 vezes maior do que a espuma posta. O tubo foi submetido à agitação manual e agitação em vórtex por 2 minutos para provocar o desprendimento da biomassa aderida ao poliuretano para a água. Após isto, foi removida a água das espumas e foram descartadas. O líquido com a biomassa foi então submetido à centrifugação para separação do material celular e descarte do sobrenadante, tal qual foi realizado em RS.

Os *pellets* formados com a biomassa de ambos os reatores foram lavados em solução tampão de sais de fosfato (*PBS*) por três vezes consecutivas, com agitação e centrifugação (5min – 9.000 RPM) para remoção de impurezas, e então congelados e armazenados em temperatura de -20 °C até o momento da extração de DNA.

4.5.2. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras dos reatores foi realizada utilizando fenol, clorofórmio e lise mecânica com auxílio de vórtex associado a aplicação de pérolas de vidro (150-212 μ m *Sigma-Aldrich*), segundo metodologia de Sakamoto, Maintinguer e Varesche (2019) . A concentração e pureza do DNA extraído foram verificadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000²⁴, que constatou em todas as amostras coletadas uma relação entre as absorbâncias a 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}) no intervalo de 1,8 a 2,0 – intervalo que sinaliza um bom nível de pureza dos ácidos nucleicos (DESJARDINS; CONKLIN, 2011).

4.5.3. Reação em cadeia polimerase (PCR)

A região V6-V8 do gene 16S do rRNA bacteriano foi amplificada utilizando os *primers* 968 FGC-1401 R, referentes ao domínio *Bacteria* (NUBEL et al., 1996). O programa de corrida do termociclador²⁵ condições a seguir: Pré-desnaturação a 95°C por 7 minutos; 45 segundos de desnaturação a 94°C; Anelamento por 45 segundos a 56°C; Extensão por 1 minuto a 72°C; extensão final por 10 minutos também a 72°C; e por fim resfriamento a 4°C.

Tabela 9 - Primers utilizados para amplificação das regiões V6-V8 do 16S rDNA do domínio *Bacteria* na técnica de PCR.

Primers	Sequências (5'-3')
968FGC	5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3' 5'-CGG
1401R	5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'

Fonte: Autor.

Para as etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram realizados 35 ciclos para os dois domínios ampliados. Os produtos das PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% e o DNA foi visualizado por coloração com *SYBR-Green* usando como referência o padrão *Low DNA Mass Ladder Invitrogen*.

²⁴ Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA.

²⁵ Eppendorf AG – 22331 Hamburg.

4.5.4. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Após a amplificação dos genes 16S rRNA, foi realizada a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) pelo método de Muyzer et al. (1993). Os produtos da *PCR* foram aplicados em gel de poliacrilamida com um gradiente linear desnaturante (ureia e formamida) de 45% a 65%. A eletroforese foi realizada em sob tensão de 75 Volts a 60 °C por período de 16 horas. O gel foi corado em solução de corante *Diamond™ Nucleic Acid Dye* (Promega) seguindo indicações do fabricante. Em seguida a imagem foi capturada com auxílio do software de fotodocumentação *L.PixTouch - Loccus Biotechnology* sob iluminação UV a um comprimento de onda de 254 nm. O perfil de bandas do DGGE foi analisado e o dendograma de similaridade foi obtido usando o software *BioNumerics V.7.2*. Para análise do índice de diversidade de Shannon (H) e Dominância (D) foi utilizado o *software Past V.3*

Figura 12 - Abertura de reator e biomassa coletada para análises de biologia molecular em RA (A) e RS (B).

Fonte: Autor.

5. RESULTADOS

5.1. Considerações iniciais

A apresentação dos resultados será dividida em discussões acerca dos parâmetros monitorados durante a operação, seguido pela discussão sobre os resultados da análise de biologia molecular através da técnica de *DGGE*. Os parâmetros abordados são avaliados em relação ao objetivo principal de remoção de cor em ambiente anaeróbio acidogênico, levando em consideração a diferença entre as estruturas físicas dos reatores de crescimento aderido (RA) e crescimento suspenso (RS). Os valores dos resultados são apresentados como a média dos dados obtidos em um determinado período $\pm$ desvio padrão. A Tabela 10 mostra como foram distribuídos os períodos de operação e a duração do tempo de coleta e análise em cada período.

Tabela 10 – Distribuição de períodos de operação.

	Inoculação	1	2	3	4	Tempo total
Período	-	1-29	41-73	85-114	117-137	
Duração (dias)	30	29	33	30	21	
TDH (horas)	72	24	18	12	6	167 dias
Período	P0	PI	PII	PIII	PIV	

Fonte: Autor.

Após a inoculação e estabilização dos reatores, foram avaliadas as melhores condições de pH e temperatura para descoloração. Em seguida, os reatores permaneceram sob observação até que os níveis de eficiência de remoção de cor apresentassem estabilidade. Os pontos de descoloração na etapa de monitoramento podem ser observados na série ilustrada na Figura 13. Nesse período, o TDH foi fixado em 72 horas para evitar arraste excessivo de biomassa. Durante a operação, não foi produzido volume significativo de biogás. A análise do gás coletado consistia, especificamente, na detecção de frações de metano (CH_4), gás sulfídrico (H_2S) e gás carbônico (CO_2).

Figura 13 – Gráfico de dispersão de eficiências de remoção de cor por varredura em RA e RS durante o período de inoculação.

Fonte: Autor.

O gráfico indica eficiência média de remoção de cor com em torno de 80%. As flutuações nos resultados foram semelhantes para ambos, indicando que foram possivelmente decorrentes de variações na concentração dos reagentes durante o preparo do efluente sintético afluente. A análise de correlação atesta a relação entre os resultados com coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,73$.

Com eficiência de remoção de cor similar entre os reatores nesse período, considerou-se que quaisquer mecanismos significativos de adsorção do meio suporte ocorrendo simultaneamente à biodegradação haviam cessado. Admitiu-se, portanto, que o limite de saturação de materiais adsorventes havia sido atingido ainda no período de testes. A Figura 14 mostra um exemplo de varredura realizada nas amostras afluente e efluente durante o período de estabilização. É possível observar queda de absorbância no intervalo do espectro visível junto à intensificação de picos de absorbância em comprimentos de onda na faixa de 200-350nm (UV), resultantes da formação de subprodutos de degradação. O perfil observado na região UV é semelhante ao que foi relatado no trabalho de Oliveira et al. (2020). Chen et al. (2003) relatam que, quando ocorrem mecanismos de adsorção, é esperado que a análise de varredura do espectro de luminoso mostre uma queda em todos os picos, de forma proporcional uns aos outros, em relação à análise de entrada. No entanto, sob ação de biodegradação, é esperada queda do maior pico de maior absorbância ou formação de novos picos. Assim, é válido sugerir que o mecanismo de biodegradação teve atuação dominante no tratamento realizado.

Figura 14 – Varredura das correntes afluyente e efluente de RA e RS no dia 29 do período de inoculação.

Fonte: Autor.

A biossorção pode ser observada na coloração do *pellet* celular. As células que adsorvem corante podem refletir sua cor específica, enquanto que pellets com suas colorações naturais indicam a predominância da ação de biodegradação (CHEN et al., 2003). Nos dias iniciais da operação, os pellets formados na corrente efluente apresentavam forte coloração (Figura 15). Com o tempo, os pellets coletados já não apresentavam mais a coloração característica do corante, e se mantiveram, dessa forma, durante toda operação. Rasool, Shahzad e Lee (2016) estudaram sobre a descoloração anaeróbia e biotransformação do corante azo *Cotton Red B* frente ao processo de redução de sulfatos em *SBR* (pH=7,5; T=35 °C). Os autores observaram contribuição da biossorção na biomassa na remoção de cor no início do experimento. O material celular atingiu equilíbrio de adsorção após 70 minutos e alcançou eficiência de remoção de 34,82%. Após esse período, não houve mudança significativa na capacidade de adsorção da biomassa. Todavia, ao final do ciclo de operação (42 horas), a biomassa utilizada recolhida havia recuperado sua coloração original, indicando que, no decorrer da operação, apesar dos indícios de biossorção inicialmente observados, a atividade biológica de degradação preponderou, ao ponto de descolorir o corante adsorvido. Os autores concluíram, portanto, que a biodegradação havia sido o mecanismo dominante na remoção de cor do efluente avaliado.

Figura 15 – *Pellet* de biomassa efluente de RA e RS no início (A) e no fim (B) do período de inoculação.

Fonte: Autor.

Analogamente, diante do que foi observado (Figura 15), considerou-se que os mecanismos de biodegradação foram predominantes nos reatores. Isso sugere que o processo tenha sido resultado, principalmente, da ação de enzimas produzidas por microrganismos capazes de promover a quebra das ligações azo, sendo os mecanismos de biossorção pouco significativos para o efeito final.

5.2. Ensaio Hidrodinâmicos

A caracterização hidrodinâmica dos reatores RA e RS foi realizada previamente ao início de sua operação, por ensaio do tipo estímulo-resposta. A partir da curva de concentração normalizada, obtida no ensaio hidrodinâmico em degrau, obtiveram-se as curvas F mostradas na Figura 16.

Figura 16 - Curva F obtida no ensaio hidrodinâmico em degrau para os reatores RA e RS com TDH de 24 horas

Fonte: Autor.

O formato da curva F resultante é típico de um ensaio em degrau em reator que possui baixa dispersão longitudinal, dado o aumento da concentração do traçador ocorrendo em curto intervalo de tempo ao valor presente na alimentação. O tempo de detenção hidráulica médio obtido pela curva de distribuição dos tempos de residência foi de 27,20 horas em RA e 19,30 horas em RS para o TDH nominal de 24 horas. O tempo de residência observado no reator RA foi suficientemente próximo ao tempo nominal, com pequeno aumento que pode ser atribuído

à possível retenção do material traçador no meio suporte através da adsorção ou difusão molecular para macroporos não conectados da matriz de poliuretano, provocando atrasos na saída do traçador. A medição do volume útil dos reatores foi realizada por meio de sucessivos preenchimentos e drenagens do reator com o meio suporte de espumas de poliuretano, no caso de RA. É possível que a fração de água retida no material suporte tenha sido significativa e, por isso, o volume pode ter sido. Já o valor de tempo de detenção médio obtido em RS abaixo do tempo nominal indica que houve possível superestimação do volume útil do reator ou erros na medição de vazão, que também levaram a erros na determinação do TDH real nos ensaios hidrodinâmicos (LEVENSPIEL, 1980).

Os dados obtidos no ensaio foram ajustados para o modelo uniparamétrico de N reatores de mistura completa em série. Pelo resultado observado, o escoamento dos reatores RA e RS pode ser adequadamente representado por aproximadamente 13 e 7 reatores de mistura completa em série, respectivamente. Segundo Levenspiel (1980), ajustes com $N > 30$ são considerados como reatores pistonado ideal sem grandes desvios e $N=1$ indica um reator de mistura completa. Portanto, concluiu-se que os reatores apresentaram certo grau de mistura, sendo a dispersão do reator RA ligeiramente menor.

5.3. Remoção de cor e formação de aminas aromáticas

5.3.1. Remoção do corante *Direct Black 22*

A biodegradação do corante foi avaliada comparando alterações de absorbância no espectro luminoso das amostras durante a operação. A Figura 17 ilustra resultado característico da varredura realizada durante a operação no afluente e efluentes. As amostras analisadas na figura foram coletadas no dia 73 da operação, durante PII.

Figura 17 – Varredura do espectrofotômetro de amostras afluyente e efluente de RA e RS no tratamento do corante DB22; destaque para a área de detecção de aminas aromáticas e absorção do corante.

Fonte: Autor.

O corante *DB22* absorve luz em toda região do espectro visível, porém o gráfico destaca a região em que há maior absorbância deste corante ($\lambda = 425$ a 575nm). As curvas efluentes mostram como a redução de cor provocou a queda de absorbância na mesma região após o tratamento, enquanto que surgem novos picos de absorbância na região UV. As mudanças observadas entre as curvas afluyente e efluente indicam atividade de biodegradação do corante azo, com formação de subprodutos incolores que não são completamente mineralizados no processo. A Figura 18 ilustra variação de cor na água residuária têxtil antes e após o tratamento nos reatores durante o período PIV.

Figura 18 – Amostras do efluente antes do tratamento (A) e após o tratamento (B).

Fonte: Autor.

Segundo Van der Zee, Lettinga e Field (2001), o comprimento de onda de maior absorvância para o corante *DB22* é de $\lambda = 484\text{nm}$. Para estabelecer um paralelo, a avaliação da eficiência de remoção de cor global do experimento, baseada na varredura de todo o espectro visível (350-700nm), foi comparada com o ponto de pico registrado na literatura. A remoção global na primeira abordagem foi de $81,33 \pm 5,54\%$ em RA e $73,11 \pm 9,72\%$ em RS, enquanto que, para $\lambda = 484\text{nm}$, foi de $76,65 \pm 6,24\%$ em RA e $70,08 \pm 10,05 \%$ em RS. A comparação mostra que os resultados são semelhantes, porém, quando avaliado todo o espectro visível, a remoção de cor é sutilmente superior, e demonstra a eficiência do tratamento para redução de cor em todo espectro visível. O boxplot da Figura 19 mostra a variabilidade das eficiências globais de remoção de cor. É possível observar que RA sofreu menos variações com as mudanças de TDH, em cada etapa.

Figura 19 – Gráfico boxplot de eficiência global de remoção de cor em RA e RS para varredura (A) do espectro e leitura do ponto de maior absorbância (B).

Fonte: Autor.

De acordo com Van der Zee e Villaverde (2005), quatro equivalentes de redução são necessários para a quebra de uma ligação azo, *i.e.*, a quantidade de substrato necessária para descoloração de 1mmol de corante monoazo é de 32 mg de DQO. Aplicando ao DB22 proporcionalmente, seriam necessários 128 mgDQO.mmol⁻¹. A concentração aplicada (32,5 mg.L⁻¹) equivale a, aproximadamente, 0,03 mmol.L⁻¹, sendo, então, teoricamente necessários 3,84 mgDQO.L⁻¹ (3,62 mg de glicose) para quebra total das ligações azo. Portanto, a oxidação

da DQO da glicose fornecida afluyente (1.060 mg.L^{-1}) não foi limitante da quantidade de elétrons da fonte de carbono para o processo de descoloração.

Ao final da etapa PI, foi observado que a concentração de glicose era ocasionalmente consumida ainda no tanque de alimentação, apesar das condições de preservação. Para avaliar o impacto, sua concentração passou a ser também monitorada para determinar momentos em que fosse necessária substituição do afluyente, além de verificar consequências desse consumo na redução de cor. Considerando que a glicose foi a única fonte de carboidratos na composição do afluyente, assumiu-se que a medida de carboidratos totais seria aproximação suficiente à concentração de glicose. A Figura 20 demonstra a concentração afluyente medida de carboidratos no momento da análise em % relativo à concentração inicialmente fornecida no preparo do efluente têxtil (1.000 mg.L^{-1}). Os valores foram comparados à eficiência de remoção de cor obtida nos reatores.

Figura 20 – Relação concentração afluyente de carboidratos e remoção de cor em RA e RS.

Fonte: Autor.

Comparando-se a eficiência de remoção de cor observada com o percentual de carboidratos presente na amostra, em relação à concentração inicialmente adicionada, o gráfico mostra não haver forte relação entre a concentração de glicose e o nível alcançado de remoção de cor. É possível notar que bons índices de remoção de cor estiveram ligados a baixas concentrações de carboidratos no afluyente. Ao realizar a regressão linear, o coeficiente de determinação (R^2) entre as variáveis foi de 0,18 para RA e 0,22 para RS. O resultado confirma

que, além da glicose, outras formas do doador de elétrons puderam ser efetivamente utilizadas no processo de descoloração redutiva, como ácidos orgânicos voláteis e hidrogênio ([Tópico 5.5.2](#)).

A Tabela 11 elenca estudos realizados com o corante *DB22* e respectivos resultados de eficiência de remoção de cor obtidos. Observa-se que o cossubstrato escolhido neste trabalho apresentou eficiência satisfatória nos reatores contínuos, especialmente no reator acrescido de meio suporte (RA). A maior eficiência registrada em RA ocorreu no dia 13, em PI, com 89,79% de remoção, enquanto que a menor eficiência ocorreu no dia 106, em PIII com 68,68%. Para o reator RS, a maior eficiência registrada foi de 84,05% no dia 41, em PII, e a menor eficiência ocorreu no dia 120, em PIV, com apenas 47,17% de remoção. Entretanto, nenhum dos reatores atingiu eficiência máxima de remoção para o corante registrada na literatura (99%) em reator *UASB* (VAN DER ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001), embora tal rendimento apenas tenha sido alcançado devido à combinação mecanismos de precipitação, redução e adsorção.

Tabela 11 – Resultados reportados na literatura de eficiência de remoção de cor do corante DB22 considerando apenas sistemas anaeróbios ou microaerados.

Corante	Eficiência média	TDH/Tempo de ciclo	Tipo de reator	Observações	Referência
<i>Direct Black 22</i>	81,33%	24	Leito estruturado fixo	340 mgSO ₄ ²⁻ . L ⁻¹ ;	Autor.
	73,11%	24	UASB-Y	Glicose -	
	78%	-	UASB	Amido	Carvalho et al. (2020).
	72%	-	UASB	Microaeração superior -	
	81,40%	24	SBR	Etanol	Menezes et al. (2019).
	74,50%		SBR	Microaeração contínua	
	76,80%		SBR	Aeração intermitente	
	92%	24	SBR	Glicose e extrato de levedura	Mohana et al. (2008).
	93%	36	SBR	Sacarose	Amorim et al. (2013).
	83%	264	SBR	40 mgSO ₄ ²⁻ . L ⁻¹ Etanol	
	52%	8	UASB	Efluente têxtil real; >300 mgSO ₄ ²⁻ . L ⁻¹	Amaral et al. (2014).
	64,41%	24	Leito estruturado fixo	Etanol 300 mgSO ₄ ²⁻ . L ⁻¹	Florêncio (2018).
	90%	24	SBR	Aeração intermitente; Glicose	Oliveira (2019).

Fonte: Autor.

A Figura 21 e Tabela 12 resumem o desempenho médio, por fase operacional, observado durante o experimento. A diminuição progressiva do TDH, nas condições estudadas, pouco afetou a eficiência de remoção de cor, apresentando quedas sutis de eficiência em relação às fases anteriores. Através do teste de hipóteses t-Student, observou-se que em PIV os desempenhos médios foram significativamente diferentes. De acordo com Galai et al. (2010) e Wu et al. (2005), valores maiores de TDH permitem maior tempo de contato entre microrganismos e substratos para degradação, enquanto que a diminuição no valor do TDH impõe cargas de corantes mais elevadas, que podem ser tóxicas aos microrganismos e inibir o metabolismo.

Figura 21 - Eficiência média de remoção de cor por período de operação em RA e RS.

Fonte: Autor.

Tabela 12 – Eficiências médias de remoção de cor por fase

Reator	Fases			
	PI	PII	PIII	PIV
RA	86,22 ± 1,81 %	82,88 ± 4,88 %	75,06 ± 3,48 %	80,79 ± 3,51 %
RS	79,64 ± 1,61 %	78,42 ± 2,83 %	73,51 ± 6,54 %	57,99 ± 6,94 %

Fonte: Autor.

Cui et al. (2016) avaliaram o efeito da variação da carga volumétrica de corante (100 a 800 g.m⁻³.d⁻¹) mediante variações no TDH no processo de descoloração, utilizando reator *UASB* com corante *Alizarin Yellow R*. Ao reduzir o TDH de 12h para 6h (400 a 800 g.m⁻³.d⁻¹),

a eficiência do reator caiu em cerca de 33%. A queda foi associada ao aumento de carga de corante, que gerou efeito inibidor na atividade metabólica microbiana e pôde ser revertida com a diminuição da carga de corante. Gadow e Li (2020) avaliaram os efeitos da variação de TDH e resiliência de biomassa em sistema de tratamento integrado anaeróbio/aeróbio mesofílico, para descoloração de efluente têxtil contendo 100 mg.L⁻¹ do corante *Acid Red 88*, em reator *UASB*. Os autores avaliaram TDH de 24, 12, 6 e 3 horas e observaram que a remoção de cor foi satisfatória para os TDH analisados, com pico de 82% no TDH de 6 horas. Todavia, sob TDH de 3 horas, o desempenho teve queda de 32,3%, atribuída ao menor tempo de contato disponível e limitação de transferência de massa do efluente para a biomassa. Com base no que foi observado, a queda de eficiência de remoção de cor observada nesse estudo pode ter sido resultado combinado do aumento de carga, com a limitação de transferência de massa pelo menor tempo de contato entre substrato e biomassa.

Em PIV, RS tem a maior queda de eficiência registrada na operação. O desempenho foi 15,52% menor em relação à etapa anterior e 22,80% menor em relação ao reator RA. Na mesma etapa, RA teve eficiência 5,73% superior em relação à etapa anterior e alcançou eficiência de 80,79%, indicando que parte da sua queda em PIII foi remediada com a adaptação da biomassa às alterações do meio. O biofilme desenvolvido em RA mitigou efeitos de toxicidade às comunidades mais sensíveis envolvidas no processo de remoção de cor, de maneira que o aumento na velocidade de descoloração foi capaz de superar a limitação da redução de TDH.

Amaral et al. (2017) observaram efeito contrário com aumento do TDH de 16 horas para 4 dias, provocando diminuição de 12% na eficiência de remoção de cor, enquanto que a eficiência de remoção de sulfatos foi de 26% para 75%. Os autores deduziram que houve limitação na transferência de elétrons para o corante, em relação aos sulfatos, devido às condições termodinâmicas estabelecidas pela composição da água residuária, capaz de determinar a predominância do aceptor preferencial. Neste estudo, entretanto, a taxa de remoção de sulfatos teve pouca variação durante toda operação, levando a crer que, por condições favoráveis em ambos processos, não houve competição significativa por elétrons para descoloração do corante *DB22* e redução de sulfatos.

O reator de leito estruturado (RA) teve eficiência superior em todas as fases de operação, indicando que o meio suporte forneceu melhores condições para a comunidade de microrganismos participantes na remoção de cor. Cabe notar que o desempenho de RA em PIV (80,79% - 6 horas) revela que fração considerável da descoloração ocorreu com poucas horas de reação. Comparando com o resultado obtido pelo mesmo reator em PI (86,22% - 24 horas), observa-se que a diferença de TDH de 18 horas entre PI e PIV pouco afetou a eficiência de

descoloração final. É possível deduzir que há uma correlação entre a velocidade de descoloração e concentração do corante, de maneira que o comportamento da taxa de descoloração assemelhe-se ao modelo cinético de primeira ordem, tal qual já observado por outros autores (FAN, 2013; HUANG et al., 2015; MURALI et al., 2013).

Galai, Limam e Marzouki (2010) comentam que o fator de diluição do efluente pode comprometer a sua descoloração. A menor quantidade de moléculas de corante disponíveis nos sítios de reação reduz o contato das mesmas com microrganismos responsáveis pela descolorização e, portanto, menos ligações azo são reduzidas para o mesmo intervalo de tempo. Vale observar que a quebra extracelular de ligações azo pode beneficiar-se da utilização de mediadores redox na transferência de elétrons de forma mais eficiente e aumentar as taxas de descoloração (SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007b; VAN DER ZEE; CERVANTES, 2009).

Nos apêndices A, B, C e D, são mostradas as superfícies de absorbâncias de amostras afluentes e efluentes, em ambos os reatores, durante as fases de operação, com destaque para a região de maior absorbância na região visível do corante.

5.3.2. Aminas aromáticas

A formação de picos de absorbância na região UV foi consistente durante todas as fases de operação, indicando que a atividade biológica permaneceu como principal responsável na remoção de cor. Gavazza, Guzman e Angenent (2015) observaram que as prováveis principais aminas aromáticas formadas a partir da quebra reductiva do corante *DB22* consistem de aminas sulfonadas, tais como anilinas, ácidos sulfanílicos e ácidos naftalenosulfônicos. As regiões espectrais de absorbância, no intervalo UV, para estas aminas aromáticas estão descritas no trabalho de Pinheiro, Touraud e Thomas, (2004). Os gráficos da Figura 22 representam varreduras da região UV de amostras de efluentes dos reatores coletadas durante PIII.

Figura 22 – Varredura espectral da região UV de amostras em PIII de operação em RA (A) e RS (B).

Fonte: Autor.

Os picos destacados nos gráficos indicam que houve formação de algumas das aminas aromáticas previstas. Segundo Pinheiro, Touraud e Thomas (2004), anilinas têm pico de absorvância em $\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ nm}$. Possivelmente, produtos derivados da anilina também foram formados como íons anilina, fenilenodiaminas e ácidos sulfanílicos nos reatores como indicam alguns picos mostrados.

Assim sendo, dentro das condições submetidas, os cromóforos do corante DB22 foram clivados, levando à formação e acúmulo de metabólitos de descoloração que não foram

completamente mineralizados. O acúmulo desses metabólitos é tóxico para os microrganismos nos reatores, podendo, inclusive, ter contribuído para a baixa remoção de DQO ([Tópico 5.4](#)) e o acúmulo de sulfetos ([Tópico 5.6.2](#)) observados nos reatores, reforçando a necessidade de pós-tratamento.

5.4. DQO e COV

Os dados de carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) e de DQO afluente e efluente dos reatores, nos diferentes períodos de operação, são demonstrados nos gráficos das Figuras 24 e 25. A DQO afluente global do efluente têxtil sintético foi de $1.225 \pm 80 \text{ mgDQO.L}^{-1}$, com médias parciais de 1.232 ± 77 , 1.286 ± 37 , 1.215 ± 85 , e $1.180 \pm 68 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ para PI, PII, PIII e PIV, respectivamente. Os valores para o afluente são equivalentes ao que é normalmente observado em estudos com efluentes têxteis reais (ALI; HAMEED; AHMED, 2009; AMARAL et al., 2014; KABRA; KHANDARE; GOVINDWAR, 2013; MOHANA et al., 2008; TELKE et al., 2010). A composição da DQO é resultante da adição do cossubstrato (1.000 mg.L^{-1} de glicose = $1.060 \text{ mgDQO.L}^{-1}$), extrato de levedura (200 mg.L^{-1}) e corante ($32,5 \text{ mg.L}^{-1}$). A DQO do corante, na concentração aplicada aos reatores, permaneceu abaixo limite de detecção ($< 10 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$) e, portanto, não exerceu influência significativa na DQO afluente.

O gráfico boxplot da Figura 23 ilustra os valores e a variabilidade da carga orgânica durante o experimento, em cada um dos períodos de operação. Os valores assemelham-se aos encontrados na literatura em outros estudos. Amaral et al. (2014) utilizaram reator UASB tratando efluentes têxteis reais com COV variando de $1,84$ a $2,7 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ durante os períodos operacionais. Sponza e Isik (2002) aplicaram diferentes cargas a reatores UASB e constataram que, para cargas entre $4-8 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$, a eficiência de remoção de DQO situou-se entre 40 e 60%, tendo havido redução (27%) com aumentos no intervalo de 5 a $25 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$.

Figura 23 – Gráfico boxplot de carga orgânica volumétrica aplicada aos períodos operacionais.

Fonte: Autor.

As amostras efluentes dos reatores foram previamente filtradas em membrana de porosidade 0,22 μm , a fim de evitar contribuições do material celular suspenso na DQO e a concentração de íons sulfeto foi insignificante durante quase toda operação como será visto no Tópico 5.6.2. Portanto, a DQO_{efl} consistiu, principalmente, de DQO_{AOV} , DQO_{resid} (Equações 6 e 7), pelo acúmulo de subprodutos de degradação fermentativa e material residual da alimentação.

Figura 24 – Gráfico de dispersão de carga orgânica volumétrica, DQO afluyente e DQO efluente de RA durante a operação.

Fonte: Autor.

Figura 25 - Gráfico de dispersão de carga orgânica volumétrica, DQO afluente e DQO efluente de RS durante a operação.

Fonte: Autor.

É possível constatar que os reatores apresentaram baixa eficiência de remoção de DQO durante todos os períodos operacionais. O resultado era esperado e decorre do fato de os reatores terem sido operados para promover apenas acidogênese, devido, principalmente, ao pH mantido e natureza do inóculo. As eficiências globais foram de $33,95 \pm 13,91\%$ e $23,75 \pm 6,69\%$ para RA e RS, respectivamente. Para atingir níveis satisfatórios de remoção de matéria orgânica, seria necessário, portanto, uma unidade de tratamento complementar, como realizado no experimento de Firmino et al. (2010).

O gráfico da Figura 26 estabelece as eficiências médias de remoção de DQO de ambos os reatores durante os períodos de operação. Em RA, as médias parciais de eficiência de remoção de DQO por período operacional de $24,24 \pm 4,35\%$, $22,25 \pm 3,43\%$, $32,0 \pm 8,8\%$ e $51,70 \pm 7,88\%$ para os períodos PI, PII, PIII e PIV, respectivamente, indicam tendência de aumento na eficiência média ao longo da operação. A análise estatística revelou que as médias de remoção de DQO em PI (TDH = 24h) e PII (TDH = 18h) não são significativamente diferentes, apesar do aumento da carga orgânica média de 1,23 para 1,72 kgDQO.m⁻³.dia⁻¹. Entretanto, a partir de PIII, com TDH de 12h, a DQO remanescente é reduzida de 963 ± 53 para 824 ± 114 mgDQO.L⁻¹, constituindo aumento relativo de 9,76% na eficiência de remoção para COV média de 2,43 kgDQO.m⁻³.dia⁻¹. Na etapa seguinte, a DQO remanescente segue tendência de queda, tendo apresentado eficiência média de remoção de $51,70 \pm 7,88\%$, com COV de 4,72

kgDQO.m⁻³.dia⁻¹. Em RS, não há aumento significativo da remoção de DQO e, com a posterior redução no TDH em PIV, a eficiência de remoção cai ao seu menor patamar desde o início da operação, atingindo média de apenas $19,03 \pm 3,21\%$.

Figura 26 – Gráfico de tendência da eficiência de remoção de DQO durante o experimento nos quatro períodos operacionais.

Fonte: Autor.

A correlação positiva entre os níveis de remoção de DQO em RA e o aumento de carga poderia significar a existência de relação de causa e efeito entre estas variáveis. Porém, como pode ser visto na Figura 19, a mesma variação de COV não provocou o mesmo efeito em RS, negando tal suposição. No estudo realizado por Amaral et al. (2014), foi constatado que, apesar do incremento de COV no sistema de reator *UASB* para tratamento de efluentes têxteis reais, não houve mudanças significativas no comportamento com relação à eficiência de remoção de DQO. A variabilidade da DQO efluente observada foi proporcional à variabilidade dos valores da concentração afluente. Em vista do exposto, não se pode afirmar que o aumento da remoção de DQO ao longo da operação em RA esteja diretamente relacionada ao aumento da COV.

Ao comparar os reatores no mesmo período, é possível observar, na passagem de PI (24h) para PII (18h), uma sutil diminuição na remoção de DQO para ambos os reatores, indo de $24,24 \pm 4,35\%$ para $22,25 \pm 3,43\%$ em RA e de $26,89 \pm 6,41\%$ para $22,92 \pm 3,82\%$ em RS. A diferença entre as quatro médias, no entanto, não se mostrou significativa, indicando que a remoção média de DQO, até esse momento, havia sido a mesma nos dois reatores. De PII (18h) para PIII (12h), ocorreu aumento nas médias de remoção de DQO de ambos os reatores.

O aumento, no entanto, foi significativo apenas em RA e permite supor que houve aumento da taxa de conversão de DQO no mesmo, a ponto de superar a limitação do menor tempo de detenção hidráulica nos reatores. É válido salientar que, em RS, não houve diferença estatística significativa entre as médias das amostras de PI e PIII. Entretanto, ao avançar para PIV (6 horas), a diferença de eficiência média entre os reatores é ampliada, com RA chegando a $51,70 \pm 7,88\%$ da DQO afluyente removida, enquanto que a remoção em RS decresce e atinge apenas $19,03 \pm 3,21\%$ de remoção.

As condições estabelecidas nos reatores deste estudo buscaram propiciar, prioritariamente, a atividade de microrganismos acidogênicos redutores azo promovendo a acetogênese e inibindo, se possível, outros eventuais processos redutores. No entanto, o nível de remoção de matéria orgânica observado em RA no período PIV permite supor a ocorrência de outros processos, sendo provável que tenha havido o crescimento de microrganismos metanogênicos. Como as demais características entre os reatores foram idênticas, o aumento contínuo e acentuado de remoção de DQO unicamente em RA indica adaptação progressiva de microrganismos que utilizam substratos formados na etapa fermentativa. É possível que RA tenha favorecido o crescimento de microrganismos metanogênicos no consórcio microbiano formado no material suporte.

Firmino et al. (2010) avaliaram o efeito da diminuição do tempo de retenção hidráulica na descoloração de efluente têxtil real e efluente sintético acrescido do corante *Congo Red* (CR) em reatores *UASB* de uma e duas fases (acidogênico e metanogênico), sob condições mesofílicas. Os resultados apontaram efeito semelhante aos aqui observados, com aumento em torno de 26,9% (32,5 - 53%) na eficiência de remoção de DQO, quando o TDH foi reduzido em 50%. Os autores sugeriram que o fenômeno ocorreu devido ao menor tempo de contato entre metabólitos tóxicos da degradação do corante e a biomassa, em virtude da diminuição do TDH.

Sponza e Isik (2002) observaram que, ao diminuir o TDH de 30 para 15,7 horas do reator *UASB* tratando o corante *RB5*, houve aumento de eficiência de remoção de DQO de 40,8% para 56%. Restrições posteriores no TDH causaram efeito contrário, com reduções progressivas na remoção de DQO. Os resultados revelaram um ponto de inflexão na curva de eficiência de remoção de DQO com a diminuição do TDH. A ocorrência sugere que pode haver um ponto ótimo entre a diminuição do efeito de inibição dos subprodutos de degradação do corante e o tempo necessário para atividade metabólica metanogênica na remoção de DQO.

Cinar et al. (2008) realizaram um estudo de sistema de tratamento *SBR* para verificar o efeito de ciclos de tempo na biodegradação do corante azo *Remazol Brilliant Violet 5R* (RBV-

5R) em efluente têxtil sintético. Foram operados reatores em bateladas com ciclos de 48, 24 e 12 horas. A mudança do ciclo anaeróbio de 24 horas para o ciclo de 12 horas resultou no aumento de 72% para 89% na remoção de DQO.

Como foi observado nos estudos citados, a diminuição do TDH reduz o tempo de contato entre a biomassa e os subprodutos (aminas aromáticas) formados durante a degradação do corante *DB22*. Logo, o aumento progressivo de vazão para redução do TDH atenuaria o efeito de compostos tóxicos nos reatores. Como foi observado em RA, é possível supor que o biofilme nesse reator tenha adquirido maior resistência aos elementos tóxicos inibidores. Como afirmam Sarayu e Sandhya (2012), culturas imobilizadas tendem a ser mais resilientes a efeitos tóxicos do que culturas livres devido à proteção desenvolvida no biofilme a comunidades mais sensíveis. Apesar de a porosidade das espumas de poliuretano ainda permitir um grau elevado de difusividade dos compostos no meio, a menor exposição, devido à redução no TDH, teria sido suficiente para que o efeito inibidor resultante a estes microrganismos fosse menor.

A ausência de medição de volume representativo de biogás no reator, entretanto, não permite confirmar a hipótese citada de maneira inequívoca. Desse modo, é possível supor que tenha ocorrido falha na medição do biogás. O cálculo do volume teórico de biogás produzido indica valor muito baixo para ser registrado pelo medidor de gás. Com relação ao metano que foi possivelmente produzido, deve-se considerar, além do pequeno valor produzido, sua dissolução na fase líquida e perda no efluente.

O reator RS não seguiu a mesma tendência apresentada por RA no que se refere à remoção de DQO. Apesar de ter tido, inicialmente, desempenho semelhante à de RA, a redução no TDH provocou queda ainda maior na eficiência de remoção de matéria orgânica nesse reator. O resultado indica que, apesar de terem partido com o mesmo inóculo, apenas a atividade acidogênica se desenvolveu e foi significativa em RS. Assim, a eficiência de remoção de DQO apresentou valores baixos, compatíveis com os normalmente observados em reatores acidogênicos. Conclui-se que RS não ofereceu condições para o crescimento de microrganismos metanogênicos, ao contrário do que pode ter ocorrido em RA. Portanto, o reator RA, em que a comunidade microbiana cresceu aderida a meio suporte, apresentou a vantagem de permitir a adaptação dos microrganismos à presença de compostos tóxicos da indústria têxtil.

5.5. pH e Ácidos Orgânicos Voláteis

5.5.1. pH

Como já mencionado, no início do experimento foram avaliadas condições de pH que melhor reproduzissem remoção de cor pelo consórcio adaptado. Observou-se que os melhores valores de remoção de cor foram observados em faixas de pH alcalinas (8,5-10,3) e que, para valores menores, abaixo de 8,5, a eficiência na remoção de cor caía em aproximadamente 35% para ambos os reatores (dados não mostrados). Por este motivo, o efluente têxtil sintético foi mantido com pH afluente entre 9,1 e 10,3, com adição de carbonato de sódio (NaCO_3), tal como realizado por Guadie et al. (2017).

O pH durante todo o processo produtivo têxtil pode variar de 5 a 13. Especificamente, na etapa de tingimento, a variação vai entre 6,3 e 10,7 (CARMEN; DANIELA, 2012; YASEEN; SCHOLZ, 2019). O pH alcalino nos efluentes têxteis tem certa recorrência na literatura. Ali et al. (2014) monitoraram o pH efluente de fabricação de toalhas de algodão por diferentes métodos e relataram valores de pH na faixa de 11 – 11,5. Mutambanengwe, Togo e Whiteley (2007), estudaram a descoloração e degradação de efluentes têxteis com enzimas hidrogenases sulfetogênicas e registraram pH pós processamento têxtil de 11,2. Khelifi et al. (2008), ao realizarem um estudo sobre descoloração aeróbia em reatores combinados contínuos, utilizaram efluente têxtil contendo corantes do tipo índigo e mediram pH de 9,56 na água residuária

Todavia, a literatura reporta extensivamente a manutenção do pH em condições neutras ou pouco ácidas (AMARAL et al., 2017; FRANCISCON et al., 2015; HUANG et al., 2015; JONSTRUP et al., 2011; KUMAR; REDDY; MOHAN, 2015; LI; GUTHRIE, 2010; RASOOL; MAHMOUD; LEE, 2015; SILVA et al., 2012; SPAGNI; CASU; GRILLI, 2012; SRIVASTAVA et al., 2013). Somasiri et al. (2008) explica que as melhores condições operacionais para reatores anaeróbios ocorrem quando o pH está próximo à neutralidade. Sob estas condições, H_2 e ácido acético, formados por atividade de bactérias acidogênicas e acetogênicas, são utilizados imediatamente e convertidos a metano por arqueias metanogênicas. A acidificação do meio líquido alcalino, tornando-o mais próximo da neutralidade, em sistemas anaeróbios, pode ser uma vantagem adicional para o crescimento das metanogênicas, que realizam a última etapa na digestão anaeróbia. As bactérias acidogênicas, mais tolerantes às flutuações de pH, podem contribuir para o controle do pH advindo dos processamentos têxteis, produzindo dióxido de carbono e ácidos orgânicos voláteis (DELÉE et al., 1998).

Considerando a natureza do elevado pH em efluentes têxteis, Guadie et al. (2017) avaliaram a possibilidade de tratar efluentes têxteis alcalinos sem a correção do pH, evitando

custos de produtos químicos. O objetivo foi aplicar um sistema de tratamento experimental em batelada intermediado por microrganismos alcalifílicos. Para isso, os autores buscaram isolar cepas de bactérias capazes de promover descoloração em condições de pH elevado usando como teste o corante *Reactive Red* (RR239). Os microrganismos alcalifílicos tem pH de crescimento ótimo próximo de 10. O experimento foi conduzido em reatores em batelada com testes em um conjunto de 7 corantes reativos. O resultado foi positivo e o consórcio atingiu descoloração total do corante (20-200 mg.L⁻¹), sob condições anóxicas e anaeróbias, à temperatura de 30 °C, com pH entre 9 e 10 nas primeiras 24 horas.

Similarmente, Lalnunhlimi e Veenagayathri (2016) isolaram um consórcio bacteriano alcalifílico a partir de amostras de solo de ambiente salino e avaliou seu potencial de descoloração com os corantes *Direct Blue 151* e *Direct Red 31*. O nível máximo de descoloração foi observado no pH 9,5, que atingiu remoção de 87% de cor ao final do 5º dia do ciclo de operação. Bons resultados também foram observados nos valores de pH de 10, 9, 8,5 e 8, com eficiências de 85, 83,2, 80,85 e 78%, respectivamente. O consórcio utilizado neste trabalho foi obtido por Oliveira (2019) a partir de solo e madeira pútrida de regiões naturais e enriquecido em meio de cultura de pH 9,6. O pH foi estabelecido a fim de favorecer a redução azo ao limitar a demanda de elétrons pela metanogênese (YUAN et al., 2006) e sulfetogênese (SHARMA et al., 2014). Sharma et al. (2014) mencionam que a inibição da sulfetogênese em efluentes de pH alcalino é resultado do acúmulo de amônia livre formado nessa faixa de pH. No entanto, a composição do efluente sintético utilizado neste trabalho não inclui fração elevada de nitrogênio e, portanto, supõe-se que o acúmulo tóxico de amônia livre não ocorreu, não obstante o pH alcalino (O composto não foi monitorado na operação). Por isso, a rota sulfetogênica ocorreu, aparentemente, sem significativas limitações ([Tópico 5.6.1](#)).

No entanto, a natureza do consórcio e posterior aclimação, em meio de cultura de pH elevado, pode ter resultado na seleção de populações com capacidade de promover a remoção de cor em condições alcalinas. Logo, a fortuita constatação acerca do pH de descoloração do consórcio é vantajosa ao tratamento desse tipo de efluente têxtil, pois o uso efetivo desses microrganismos pode poupar custos com produtos químicos reguladores de pH.

O controle combinado dos parâmetros de pH e temperatura pode influenciar na fermentação anaeróbia, modificando as taxas nas etapas de hidrólise e produção de ácidos orgânicos. É possível observar (Tabela 3) que muitos dos estudos de degradação de corantes são realizados sob condições mesofílicas (26-40 °C). Apesar, porém, de já haver estudos realizados em reatores operados na faixa termofílica, buscando explorar a alta temperatura em que os efluentes têxteis são produzidos (DOS SANTOS et al., 2003; DOS SANTOS;

CERVANTES; VAN LIER, 2004; ALI; HAMEED; AHMED, 2009; SOLÍS et al., 2012). Com algumas exceções, como corantes reativos contendo triazina²⁶, o panorama geral aponta uma associação satisfatória entre condições mesofílicas e várias espécies de microrganismos capazes de descolorir corantes sintéticos. Esses microrganismos são tradicionalmente empregados em tratamento de águas com cor, pois, o tratamento a altas temperaturas não é considerado economicamente viável. Por esta razão, os reatores foram mantidos em condições mesofílicas, a 30 °C. Zhang, Chen e Zhou (2009) observaram que, sob condições mesofílicas, a produção de ácidos orgânicos foi máxima com o pH ajustado para 9. Os autores concluíram que a combinação entre os parâmetros atingiu o ponto ótimo entre as taxas de hidrólise e acidificação. O estudo sugere que, quanto maior a temperatura de fermentação, menor será o valor de pH necessário para atingir a produção máxima de ácidos orgânicos. Em condições semelhantes, neste estudo foram também verificadas elevadas concentrações de ácidos orgânicos no efluente dos reatores, como será visto no tópico seguinte.

Figura 27 – Gráfico de dispersão dos valores de pH afluentes (afl) e efluentes (efl) em RA e RS durante os períodos de operação.

Fonte: Autor.

A Figura 27 mostra que, no decorrer da operação, não ocorreram mudanças significativas no pH afluente e efluente. O afluente teve média geral $9,87 \pm 0,4$ e os efluentes tiveram valores médios de $8,58 \pm 0,14$ em RA e $8,38 \pm 0,14$ em RS. Há uma ligeira e consistente diminuição no valor do pH efluente para ambos os reatores em toda operação. O fato está

²⁶ Apresentaram baixas taxas de descoloração sob condições mesofílicas (SANTOS et al., 2003)

principalmente atrelado ao acúmulo de ácidos orgânicos que ocorreu no reator. O efeito pode ter sido tamponado pela alcalinidade advinda da redução de sulfatos por BRS (MUYZER; STAMS, 2008; OZDEMIR et al., 2013).

A elevada eficiência de remoção de cor obtida nesse trabalho permite algumas ilações sobre o tipo de enzimas responsáveis pelo processo de descoloração, que atuam nessa faixa de pH. Nicolas et al. (2003) reporta, como faixa ótima para a atividade, valores de pH de 4 a 7 para peroxidases e 4 a 7,5 para lacases, a depender do substrato que seja usado. Azorredutases, no entanto, são estáveis em larga faixa de pH, abrangendo valores de 5-9 (MISAL; GAWAI, 2018). Dessa forma, considerando o rendimento experimentado por ambos os reatores com pH afluente entre 9 e 10, é possível sugerir que azorredutases foram as principais enzimas envolvidas no processo redutivo.

5.5.2. Ácidos Orgânicos Voláteis

Os ácidos orgânicos voláteis (AOV) no efluente dos reatores foram produzidos a partir da fermentação da glicose. Análises realizadas revelaram que houve acúmulo de AOV nos efluentes dos reatores, durante a operação (Figura 22). A literatura reporta que, sob condições alcalinas, a produção e acúmulo de AOV é significativamente maior do que em qualquer outra condição (CHEN et al., 2007; WANG et al., 2017; YUAN et al., 2006; ZHANG et al., 2010). Segundo Yuan et al. (2006), o acúmulo de AOV nessas condições é consequência, principalmente, do aumento da taxa de hidrólise para produção de mais substratos para acidificação além da glicose, e inibição da atividade metanogênica. Os autores verificaram que a formação e acúmulo de ácidos orgânicos, a partir a glicose (substrato utilizado neste estudo), foi evidentemente superior em condições alcalinas (pH 10) do que em condições ácidas (pH 5). Isto posto, deduz-se que a causa para o acúmulo de ácidos orgânicos observada neste estudo foi causada pelo elevado valor do pH e à natureza do inóculo utilizado que limitaram crescimento de microrganismos metanogênicos. A variação de concentração de ácidos no efluente dos reatores é apresentada na Figura 28.

Figura 28 – Concentração de ácidos orgânicos voláteis no efluente dos reatores RA (A) e RS (B).

Fonte: Autor.

Cerca de seis tipos de ácidos foram identificados no decorrer da operação, com prevalência do ácido acético (HAc), seguido do ácido propiônico (HPr). A formação de ácido acético está relacionada à ação de bactérias acidogênicas e acetogênicas, na conversão de glicose e ácidos orgânicos de cadeia de carbono maior do que a do ácido acético. Segundo Mccarty (1971) *apud* Aquino e Chernicharo (2005), a formação de ácido acético canaliza cerca

de 70% dos elétrons do substrato originário. A conversão pode estar ligada à presença de microrganismos hidrogenotróficos homoacetogênicos. Além disso, a atividade de bactérias redutoras de sulfatos na oxidação incompleta de matéria orgânica pode também resultar na formação de acetatos, como será visto ainda, em mais detalhes, no [Tópico 5.6.1](#). A atividade desses microrganismos pode justificar a predominância do ácido acético durante toda operação. Também foram observadas pequenas frações de ácido isovalérico (i-HVa) e ácido butírico (HBu) em algumas amostras. A hidrólise e acidogênese resultante de substratos como carboidratos, proteínas e lipídios leva à produção de ácidos como acético, propiônico, butírico. Entretanto, ácidos de maior peso molecular como valérico e isovaléricos derivam principalmente da fermentação de proteínas, sendo escassa sua concentração a partir de substratos não-proteicos (CHEN et al., 2007). Como o único substrato amplamente disponível neste trabalho foi a glicose, o fato citado pode justificar a limitada presença de ácido isovalérico observada. Outros AOV como crotônico, capróico e isobutírico foram considerados virtualmente ausentes.

Figura 29 – Percentual médio relativo de AOV nos reatores por etapa operacional em RA (A) e RS (B).

Fonte: Autor.

A ordem geral de concentração dos principais ácidos orgânicos foi HAc > HPr > HBu/i-HVa (Figura 29), semelhante à de outros experimentos realizados na mesma faixa de pH (CHEN et al., 2007; YUAN et al., 2006; ZHANG; CHEN; ZHOU, 2009) e também observado em trabalhos com efluentes têxteis (AMARAL et al., 2014; CUI et al., 2016; GAVAZZA; GUZMAN; ANGENENT, 2015; SPAGNI; CASU; GRILLI, 2012). A degradação de glicose e formação dos ácidos orgânicos, durante toda operação, indicam que a atividade de bactérias acidogênicas e acetogênicas não sofreram inibição devido à concentração de DQO afluente ou dos produtos intermediários formados durante a operação.

Segundo Santos, Cervantes e Van Lier (2007), os ácidos orgânicos voláteis produzidos a partir da fermentação de material orgânico, em geral, não são bons doadores de elétrons para a redução de corantes azo em ambientes anaeróbios. Por serem reatores acidogênicos, esse fato pode ter contribuído para o forte acúmulo de ácidos no efluente dos mesmos. Entretanto, Li et al. (2014) observaram que, apesar disso, o hidrogênio coproduzido nas etapas de acidogênese e acetogênese pode ser um potencial doador de elétrons para a redução de ligações azo. Os autores notaram que, sob certa concentração de corante azo (35 mg.L^{-1}), a taxa de conversão acetogênica dos ácidos propiônico e butírico aumentou em relação ao reator de controle (sem adição de corante). Além disso, a análise microbiológica relevou maior abundância relativa de bactérias acetogênicas utilizadoras de propionato no reator contendo corante azo. Como se sabe, na digestão anaeróbia, a acetogênese a partir de ácidos como butírico e propiônico só é termodinamicamente possível sob estreita faixa de pressão parcial de hidrogênio, que é mantida às custas do consumo contínuo do mesmo por outros microrganismos em relação de sinergia (HARPER; POHLAND, 1986). Li et al. (2014) observaram também que a fração de hidrogênio

no biogás do reator com corante foi praticamente nula, comparada ao reator de controle. Os autores concluíram que o produto havia sido consumido ainda na fase líquida, aliviando a pressão parcial de hidrogênio para manutenção da formação de acetatos e atuando significativamente na descoloração do efluente.

Com a limitação às populações metanogênicas imposta pelo pH e produtos tóxicos nos reatores deste estudo, a retirada de hidrogênio via metanogênese foi comprometida e, no entanto, a predominância de acetatos em relação aos demais ácidos foi mantida. Apesar disso, não houve formação significativa de biogás nos reatores ao longo de toda operação. Embora também seja comum que o hidrogênio seja consumido por bactérias redutoras de sulfato (reação 4) e outros microrganismos homoacetogênicos, além da produção de outros ácidos como láctico (AQUINO; CHERNICHARO, 2005), é possível que, na presença do corante, o hidrogênio tenha também atuado como doador de elétrons para redução de ligações azo. O consumo teria contribuído para manter baixa a pressão parcial de hidrogênio, condição necessária à manutenção de rotas acidogênicas e acetogênicas.

De acordo com as reações a seguir (HARPER; POHLAND, 1986), a produção de hidrogênio nas reações de acetificação de propionato e butirato é de 3 e 2 molH₂/molÁc., respectivamente. Entretanto, a conversão do butirato é mais favorável termodinamicamente ($\Delta G^0 = +48,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$) em relação ao propionato ($\Delta G^0 = +76,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$) (reação 13 e 14). Como consequência, é esperada maior a taxa de conversão de ácido butírico em relação ao ácido propiônico, o que justificaria a ordem de prevalência final observada entre esses ácidos.

Figura 30 – Concentração média de ácidos orgânicos voláteis totais no efluente dos reatores durante os períodos experimentais.

Fonte: Autor.

De acordo com o gráfico da Figura 30, a concentração de ácidos totais nos reatores decresceu de forma consistente e idêntica com a diminuição do TDH aplicada aos dois reatores. No entanto, apesar disso, a DQO efluente solúvel, especialmente em RS, foi elevada durante toda operação. Sendo assim, a queda na concentração efluente de AOV indica que a matéria orgânica permaneceu na forma complexa de carboidratos por limitações na atividade acidogênica ou na forma de ácidos não detectáveis pelo método utilizado, como ácido lático. O fenômeno pode ter decorrido, em primeira análise, devido a efeitos de toxicidade provocados pelo aumento de carga de corante e matéria orgânica com a redução do TDH. Entretanto, Gavazza, Guzman e Angenent (2015) observaram que, com o incremento na concentração do corante DB22 em seus reatores, o equilíbrio termodinâmico e a sinergia na comunidade microbiana foram afetados, culminando em maior acúmulo de ácidos acético e propiônico no efluente. O aumento no acúmulo de ácidos orgânicos decorrente do aumento na concentração de corante também foi notado nos trabalhos de Cui et al., (2016), Dai et al. (2016) e Sponza e Mustafa (2005) e nos trabalhos de Dai et al. (2018) e Silva et al. (2014) com o aumento na concentração de glicose. O resultado desses trabalhos sugere que o aumento da carga volumétrica de corante aqui aplicada tenderia a causar, inicialmente, efeito oposto na produção de ácidos orgânicos ao que foi verificado, indicando que a causa para o fenômeno aqui observado foi outra.

Por outro lado, a redução na concentração de ácidos orgânicos totais pode ser resultado de limitações cinéticas impostas pela mudança no TDH. No trabalho de Chen et al. (2007), foi observado que SBR metanogênicos mantidos em pH alcalino tiveram concentração de ácidos orgânicos crescente no decorrer do ciclo operacional. Aoyagi et al. (2017) relataram tendência semelhante ao variar o TDH de 25 a 5 horas em reator acidogênico e verificar que as concentrações de ácidos acético propiônico decresceram, respectivamente, de 1,4-1.8 e 0,7-0,8mM, até tornarem-se indetectáveis sob TDH de 5 horas. Logo, é possível que a redução na concentração de ácidos efluente decorra de limitações cinéticas nas etapas de acidogênese, levando a taxas de conversão de ácidos orgânicos progressivamente menores.

5.6. Sulfatos e Sulfetos

5.6.1. Sulfatos

A concentração média afluyente de sulfatos, durante a operação, foi mantida em torno de $343 \pm 78 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo as concentrações finais globais de $79 \pm 24 \text{ mg.L}^{-1}$ em RA e $101 \pm 24 \text{ mg.L}^{-1}$ em RS, registrando respectivas eficiências de remoção de $76,74 \pm 6,99\%$ e $70,47 \pm 9,23\%$. A remoção de sulfatos indica a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS) no consórcio microbiano. Segundo Muyzer et al. (2008), as BRS podem crescer por vias fermentativas e acetogênicas, tanto em culturas livres, como em consórcio com outros microrganismos, o que justificaria sua abundância mesmo em ambientes pobres em sulfatos. O gráfico boxplot da Figura 31 descreve a variabilidade global dos resultados afluyente e efluente nos reatores.

Figura 31 – Gráfico boxplot de concentrações globais de sulfatos afluyente e efluente em RA e RS

Fonte: Autor.

A Figura 31 mostra que, durante toda operação, as concentrações efluentes de sulfato mantiveram-se estáveis, apresentando pequena dispersão, apesar das reduções progressivas no TDH e acúmulo de metabólitos tóxicos nos reatores. A estabilidade indica que boa parte da remoção de sulfatos ocorreu ainda nas primeiras horas de contato com o substrato e não foi afetada pelo aumento de nível de produtos tóxicos no meio reacional. Na Figura 32, são mostradas as concentrações de sulfatos afluente e efluente e eficiências médias de remoção parciais nas etapas do estudo. As médias parciais foram $77,55 \pm 6,40\%$, $77,51 \pm 2,39\%$, $71,38 \pm 8,13\%$ e $80,12 \pm 5,66\%$ em RA e $71,33 \pm 7,41\%$, $70,18 \pm 2,79\%$, $71,86 \pm 7,88\%$ e $65,65 \pm 12,78\%$ em RS, para PI, PII, PIII e PIV, respectivamente.

Figura 32 – Concentrações afluente e efluente de sulfatos em RA e RS e respectivas eficiências de remoção por período operacional.

Fonte: Autor.

Constatou-se que os resultados dos efluentes entre os reatores de PI a PIII foram estatisticamente idênticos, indicando que a estrutura dos reatores teve pouco impacto na remoção de sulfatos devido a variações no TDH. No entanto, a eficiência de remoção em RA foi ligeiramente superior em quase toda operação e registrou maior nível de eficiência em PIV, enquanto que, na mesma etapa, a eficiência média de RS foi a menor observada em toda operação. SILVA et al. (2006) estudaram o grau de adesão de BRS e arqueias metanogênicas em materiais suporte. A maior concentração específica de biomassa relacionado à aderência de

BRS, entre os materiais estudado, ocorreu em espumas de poliuretano, material empregado como meio suporte no reator RA neste estudo. O material suporte em RA pode, portanto, ter favorecido a proliferação de destes microrganismos neste reator e resultado no melhor rendimento de conversão de sulfatos observado.

Vasquez et al. (2016) discutiram sobre a influência do TDH em sistemas de tratamento de águas residuárias. Sabe-se que sistemas com TDH muito curto podem não permitir tempo adequado para mineralização completa de matéria orgânica, enquanto que TDH longos podem esgotar substratos ou favorecer o acúmulo de material celular ou minerais precipitados, diminuindo a condutividade hidráulica ou provocando curtos-circuitos no sistema de tratamento. No presente estudo, porém, a mudança do TDH no decorrer da operação parece não ter exercido impacto significativo sobre BRS, que obtiveram níveis de eficiência semelhantes para todos TDH avaliados.

A estabilidade na remoção de sulfatos, para diferentes valores de TDH, também foi avaliada por Aoyagi et al. (2017). Os autores estudaram a eficiência de remoção de sulfatos em reator de leito empacotado, sob condições de pH próximas à neutralidade. Durante a operação, a remoção de sulfatos foi estável enquanto o reator operou sob TDH de 25, 12, 8, 6 horas. No menor valor de TDH estudado (5 horas), a eficiência de remoção foi reduzida significativamente e o reator apresentou concentrações de sulfato efluente próximas às da entrada. Esse fato indicaria que o limite para o tempo de conversão do composto havia sido atingido. Os valores de remoção de sulfato observados neste estudo foram estáveis e indicam que o tempo reacional necessário para redução do íon foi suficiente.

No estudo de Amaral et al. (2017) sobre a influência do TDH na remoção de corantes azo e sulfatos, em tratamento sequencial anaeróbio-aeróbio com efluentes têxteis reais, constatou-se que o aumento do TDH favoreceu a redução de sulfato em detrimento da redução dos corantes. A mudança demonstrou que houve limitação na transferência de elétrons para os corantes, em relação aos sulfatos. Os autores consideraram que a presença de compostos tóxicos no efluente têxtil pode ter inibido a ação dos microrganismos que removem cor, porém, o mesmo não ocorreu com as BRS. Neste estudo, da mesma forma, o pH alcalino e aumento da concentração de outros compostos tóxicos como sais e corante por unidade de volume no reator não pareceram afetar a atividade das bactérias BRS, sugerindo maior resiliência desses microrganismos (MUYZER; STAMS, 2008).

O efeito de sulfatos na degradação de corantes azo é ambíguo. A concentração de sulfatos modifica o potencial de oxirredução do meio, de maneira que maiores concentrações de sulfatos a serem reduzidos resultam em menores potenciais redox, devido ao potencial

redutivo $E'_0 = -220\text{mV}$ para $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$. O potencial resultante das reações do composto é capaz de determinar a preponderância nas reações e determinar relações de competição por elétrons (CIRIK; KITIS; CINAR, 2013). Entretanto, a literatura indica que, desde que haja doadores de elétrons suficientes, não haverá competição entre redução de ligações azo e sulfatos (ALBUQUERQUE et al., 2005; BOONCHAYAANANT et al., 2013; CERVANTES; ENRIQUEZ; FIELD, 2006; OZDEMIR et al., 2013; RASOOL; MAHMOUD; LEE, 2015). Cervantes et al. (2006) estudaram o efeito de redução de sulfatos na descoloração do corante *Reactive Orange 14*, com concentrações de sulfato incrementais em SBR. Os autores observaram que houve dominância de remoção de sulfatos apenas quando o aumento da concentração do mesmo tornou insuficiente a capacidade redutiva do meio, com razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-} = 0,1$. Semelhantemente, Rasool et al. (2015), trabalhando com SBR contendo corante (*Direct Red 80*) e sulfatos, observou queda nas eficiências de redução de cor e sulfatos ao limitar a DQO afluente de 3.000 para 500 mg.L^{-1} . Rasool, Woo e Lee (2013) estudaram a degradação do corante *Direct Red 80*, em SBR anaeróbios sob elevadas concentrações de sulfato, e observaram que concentrações de até 5.000 mg.L^{-1} de sulfato não produziram impacto significativo na remoção de cor ($\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}=0,6$). Amorim et al. (2013) estudaram o comportamento redutivo do corante *DB22* com sacarose e etanol como cossustratos e riboflavinas e lawsone em efluentes têxteis sintéticos e reais ricos em sulfatos. Os autores concluíram que a presença de sulfatos não foi capaz de afetar a remoção de cor para nenhum dos substratos empregados.

Neste trabalho, a remoção de cor e de sulfatos ocorreu simultaneamente de forma estável durante a operação, o que indica não ter havido conflito na disputa por elétrons entre os microrganismos envolvidos. Com DQO de entrada de $1.225,28 \pm 80,33 \text{ mgDQO.L}^{-1}$, a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ média foi de 3,57. Segundo, Van Lier, Mahmoud e Zeeman, (2008), para valores da $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-} > 0,67$, não há limitação de matéria orgânica para conversão total de sulfatos, o que indica que a DQO de entrada não limitou a atividade microbiana sulfetogênica neste trabalho. Considerando a concentração de sulfatos afluente, a DQO necessária para a remoção total seria de cerca de 230,04 mgDQO.L^{-1} , restando ainda cerca de 986,24 mgDQO.L^{-1} . Portanto, a DQO de entrada foi suficiente, não só para redução da carga de sulfatos como, também, para disponibilizar matéria orgânica para a remoção de cor na concentração de corante provida.

Embora a presença de sulfatos possa estabelecer relação de competição para redução de cor sob limitação de matéria orgânica, a literatura sugere que pode haver relação positiva entre BRS e bactérias redutoras de ligações azo. Cirik, Kitis e Cinar (2013) discutiram sobre o

impacto positivo de maiores concentrações de sulfatos na biodegradação de ligações azo. O acúmulo do íon pode diminuir o potencial de oxirredução do meio proporcionalmente à quantidade do composto que é biologicamente reduzida, gerando impacto positivo na biodegradação de azo, que se beneficiam de potenciais redox <-150mV. Também há a possibilidade de contribuição por cofatores envolvidos na redução de sulfatos como citocromo C₃ e NADH, canalizando elétrons para corantes azo e sulfetos biogênicos como doadores de elétrons ([Tópico 5.6.2](#)). Considerando os resultados e condições deste trabalho, não se pode descartar a possibilidade de que a concentração de sulfatos fornecida tenha exercido impacto positivo na descoloração reductiva.

Sulfatos podem ser biologicamente reduzidos por bactérias autotróficas ou heterotróficas com uso de diversos doadores de elétrons (hidrogênio, aminoácidos, ácidos carboxílicos, álcoois, açúcares) (CAO et al., 2012). Rasool et al. (2015) afirmam que a maior parte das BRS oxidam substratos orgânicos de forma incompleta a acetato, enquanto espécies capazes de oxidar acetatos e outros compostos orgânicos completamente a CO₂ são menos comuns e mais sensíveis a concentrações de sulfetos. A produção de acetato durante a remoção biológica de sulfatos é desvantajosa pois, apesar de serem doadores viáveis, espécies de BRS capazes de degradar acetato levam mais tempo para estabelecer atividade significativa no consórcio (MUYZER; STAMS, 2008; OMIL et al., 1998). Observando as concentrações efluente de acetatos, deduz-se que o consórcio não era rico nesse tipo de BRS. As demais espécies redutoras de sulfatos são pouco eficientes para oxidar o acetato, mesmo em concentrações de sulfato em excesso, resultando em maior DQO efluente (LENS et al., 2002). Com a suplementação de glicose como doador de elétrons, os sulfatos são biologicamente reduzidos de acordo com as reações a seguir (CAO et al., 2012; LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007):

De acordo com a reação (15), observa-se que 1 mg de SO₄²⁻ pode produzir até 1,23 mg de acetato. Se considerada a reação como rota dominante, de acordo com as remoções médias de sulfato observadas, a redução de sulfatos pode ser responsável pelos percentuais relativos na concentração de acetatos ilustrados na Figura 33.

Figura 33 – Abundância relativa máxima de acetatos por oxidação incompleta de sulfatos em RA e RS.

Fonte: Autor.

A literatura reporta que o substrato utilizado pode influenciar as taxas de remoção de sulfatos. Doadores de elétrons distintos resultam em proliferação de diferentes espécies de BRS. Segundo Cao et al. (2012), a complexidade da molécula doadora e suas rotas de degradação podem influenciar a tolerância das BRS ao acúmulo de sulfetos de hidrogênio, devido à diversidade de populações bacterianas estabelecida ante a complexidade do doador de elétrons. Por exemplo, Amorim et al. (2013) avaliaram o comportamento da redução do corante *DB22*

simultaneamente à remoção de sulfatos utilizando diferentes cossustratos (etanol e sacarose). Para o mesmo efluente de entrada, a remoção completa de sulfatos ocorreu em 48 e 120 horas, para etanol e sacarose, respectivamente. Em acordo com esse estudo, Rasool et al. (2015) reportaram que, a partir de um mesmo lodo de inoculação, a aplicação de diferentes cossustratos em diferentes reatores influenciou na diversidade das comunidades microbianas. Dentre os substratos avaliados no estudo, a remoção de sulfatos foi melhor atingida na presença de lactato e etanol. O reator suplementado com lactato obteve maior abundância relativa de BRS no consórcio verificada no estudo, enquanto que no reator alimentado com glicose obteve a menor. Ainda, foi observado que o reator alimentado com glicose teve menor abundância relativa de *táxons* de BRS capazes de oxidar acetatos (*Desulfococcus*), sob condições anóxicas (9,61%²⁷). Os eventos observados nesses estudos sugerem que glicose não é um bom substrato para proliferação de BRS oxidadoras completas, podendo ter contribuído para o acúmulo observado nos reatores neste estudo, mesmo sendo um substrato termodinamicamente propício para redução de sulfatos.

5.6.2. Sulfetos

Os valores de sulfetos na fase líquida foram irrisórios durante a maior parte da operação, apesar da atividade redutora de sulfatos por BRS. De acordo a Figura 5, pelo pH médio efluente nos reatores (8-8,5), os sulfetos produzidos estariam disponíveis, principalmente, na forma de bissulfetos (HS^-), dissolvidos na fase líquida. Portanto, considerou-se que a concentração de sulfetos na fase líquida seria reflexo da concentração total produzida do composto. A consideração foi amparada pela baixa produção de biogás nos reatores.

A concentração global de sulfetos teve valor médio de $355,63 \pm 150,21 \mu g.L^{-1}$ em RA e $423,04 \pm 144,52 \mu g.L^{-1}$ em RS. Considerando que as medições realizadas podem ter sofrido interferências da cor efluente nas amostras, é possível que os valores aferidos tenham ainda sido superestimados, não podendo assim excluir a hipótese que o composto reduzido tenha sido completamente removido dos reatores. Os gráficos de dispersão da Figura 34 mostram a distribuição das concentrações analíticas medidas em relação às quantidades teóricas calculadas, a partir do teor de sulfato removido nas amostras coletadas.

²⁷ Reator suplementado com lactato obteve 27,84% desse mesmo táxon.

Figura 34 – Gráficos de dispersão de distribuição da concentração teórica e medida de sulfetos no efluente em RA (A) e RS (B).

Fonte: Autor.

Os resultados revelam que as concentrações medidas foram aquém do que era teoricamente esperado, evidenciando conversão do composto ainda nos reatores. No decorrer do experimento, verificou-se a formação de material precipitado nos reatores, acumulado durante toda operação (Figura 35). O resíduo depositou-se na saída dos reatores, *headspace* ((A) e (B)), paredes e lodo de fundo ((C) e (D)).

Figura 35 – Material acumulado nas saídas (A e B) e leito (C e D) dos reatores.

Fonte: Autor.

Fenômeno semelhante foi observado em outros estudos realizados com corantes em águas residuárias com sulfatos (CARVALHO, 2016; FLORÊNCIO, 2018; SILVA, 2017). Os autores desses trabalhos concluíram se tratar do resultado da oxidação de sulfetos a enxofre elementar, material que, por ser insolúvel em meio aquoso, é precipitado. Para confirmar sua ocorrência neste estudo, amostras do material foram coletadas e submetidas à análise para quantificação de enxofre elementar (GODOI et al., 2019). O resultado positivo confirmou a presença de enxofre elementar, tal qual ocorreria nos estudos citados. A formação pode ocorrer por via química ou biológica, simultaneamente.

As imagens da Figura 35 mostram que o acúmulo do material se concentrou, principalmente, no *headspace* e pontos próximos às saídas dos reatores. A possível justificativa é o contato do efluente com oxigênio nessas regiões dos reatores, gerando zonas microaeradas próximas à superfície da massa líquida. A oxidação parcial de sulfetos a enxofre elementar é viável sob baixas concentrações de oxigênio ($OD < 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), que limitam a reoxidação de

sulfetos a sulfatos (BUISMAN et al., 1990; MUYZER; STAMS, 2008; POKORNA; ZABRANSKA, 2015). As condições mantidas nos reatores e valores teóricos de formação de sulfetos de 91 ± 23 e 83 ± 25 mg.L⁻¹ em RA e RS, respectivamente, tornam pouco provável que pudesse haver a conversão de sulfetos novamente a sulfatos. Possíveis rotas de oxidação são descritas nas reações 17 e 18.

A conversão de sulfetos a enxofre elementar pode, também, ser resultado do efeito redutor que sulfetos podem exercer sobre corantes azo, utilizando-os como aceptores de elétrons. Sulfetos dissolvidos podem ser quimicamente oxidados na presença do corante, que atua comoceptor de elétrons viável, sem enfrentar competição com os sulfatos por esse doador de elétrons. O corante é quimicamente reduzido diretamente por sulfetos, que são transformados em enxofre elementar ou polissulfetos, enquanto a ligação azo é quebrada, contribuindo com o processo de descoloração do corante azo (reação 19) (CIRIK; KITIS; CINAR, 2013; PRATO-GARCIA; CERVANTES; BUITRÓN, 2013; VAN DER ZEE et al., 2003; YOO; LIBRA; WIESMANN, 2000).

A reação requer 8 mols de sulfeto por 1 mol de corante tetra-azo. Logo, são necessários 264 mg.L⁻¹ de sulfeto para a redução completa de 1 mol do corante DB22 (VAN DER ZEE et al., 2003). Na concentração de corante aplicada neste estudo (0,03 mM), seriam exigidos 7,92 mg.L⁻¹ de sulfetos para redução completa. A quantidade teoricamente produzida, então, seria mais do que suficiente para quebra total das ligações azo. No entanto, o nível efetivo de contribuição de sulfetos na redução química de corantes azo é incerto e depende múltiplos de fatores no meio reacional.

Segundo Van der Zee et al. (2003), a participação de sulfetos na descoloração redutiva é acelerada na presença de mediador redox compatível, fato este confirmado por Cervantes et al. (2006) e Prato-Garcia et al. (2013) e é somada às contribuições biológicas. Entretanto, em reatores anaeróbios de alta taxa, mecanismos biológicos têm maior impacto nos resultados. Kim, An e Kim (2008) comprovaram o aumento na taxa de remoção de cor do corante *Reactive Black 5* e efluente têxtil real, conforme a concentração de entrada de sulfetos era aumentada.

A distribuição de dados em RS (Figura 28) mostra que, em PIV, RS apresentou pontos de aumento significativo na concentração do composto, atingindo valores próximos à

estimativa teórica. O crescimento possivelmente decorre do aumento de carga provocado pela diminuição do TDH, que inibiu a rota de conversão de sulfetos, culminando no acúmulo do composto nesse reator. Pokorna e Zabranska (2015) comentam que altas concentrações de sulfetos e nutrientes pode trazer efeitos adversos às bactérias oxidadoras de sulfetos. Vale salientar, também, que o efeito observado em RS não ocorreu em RA, que permaneceu na mesma faixa de valores de concentração de sulfetos durante toda a operação. A estabilidade observada paralelamente em RA pode estar relacionada ao maior nível de resiliência em culturas de crescimento aderido, que permitiu a manutenção da remoção de sulfetos do meio, enquanto que RS esteve mais suscetível às alterações nos fatores ambientais. A estrutura do biofilme formado contribui para a proteção de culturas mais sensíveis, mitigando possíveis efeitos adversos do acúmulo de compostos tóxicos (SARAYU; SANDHYA, 2012).

Figura 36 – Concentrações de sulfeto teóricas e observadas em RA (A) e RS (B).

Fonte: Autor.

Os gráficos da Figura 36 ilustram os níveis médios de sulfetos encontrados em cada fase dos reatores, em relação aos valores teóricos. Os valores medidos mostraram-se praticamente ausentes. No entanto, a área correspondente a PIV de RS, as concentrações analíticas foram divididas em duas colunas. Na coluna menor, a concentração média efluente foi semelhante ao que ocorrera nas fases anteriores. A coluna seguinte representa a concentração média observada a partir do dia 132 da operação, onde foi observado aumento na concentração de sulfetos. O valor da coluna nesse trecho ($62,91 \pm 9,89 \text{ mg.L}^{-1}$) é bastante próximo à estimativa teórica ($68,058 \pm 12,94 \text{ mg.L}^{-1}$), indicando que as rotas dominantes na remoção de sulfetos haviam sido comprometidas.

No mesmo período em que ocorreu o acúmulo de sulfetos (PIV), houve maior queda de eficiência de remoção de cor no reator RS ([Tópico 5.3.1](#)), sugerindo alguma participação de sulfetos no processo de descoloração reductiva. No entanto, a redução de remoção de cor nessa fase foi insuficiente para atribuir dominância da redução por sulfetos no processo, podendo ser apenas responsável por uma fração menor da descoloração resultante. Logo, é provável que a remoção de sulfetos decorra de outros mecanismos de transformação, tais como reação de sulfetos com íons metálicos, formando sulfetos metálicos insolúveis, formação de enxofre elementar em zonas microaeradas ou conversão para outras formas de enxofre, como polissulfetos e sulfitos por bactérias quimiolitotróficas.

5.7. Sais

A concentração de sais, medida através da condutividade elétrica no efluente, não apresentou grandes alterações durante o tratamento. A condutividade média afluyente durante a operação foi de $4,92 \pm 0,27 \text{ mS.cm}^{-1}$ e as concentrações efluente foram $4,90 \pm 0,29 \text{ mS.cm}^{-1}$ em RA e $4,81 \pm 0,31 \text{ mS.cm}^{-1}$ para RS. O resultado mostra que não houve alteração relativa ao teor de sais no efluente têxtil biologicamente tratado, sendo o efeito inibitório do efluente similar ao do efluente bruto (Figura 37).

Figura 37 – Condutividade média de entrada e saída medida durante a operação.

Fonte: Autor.

A eficiência de remoção de cor alcançada não parece ter sofrido impacto pela concentração de sais. Isik (2004) e Punzi et al. (2015) observaram resultado semelhante entre esses parâmetros. O aumento gradativo da concentração de NaCl em reatores anaeróbios tratando efluentes têxteis teve efeito inversamente proporcional na remoção de DQO. Porém, não houve queda na eficiência de remoção de cor, que permaneceu estável em ambos os estudos para todas as variações de concentrações de sais.

A estabilidade de bactérias que degradam corantes azo sob altas concentrações de sais é reportada na literatura. Asad et al. (2007) isolaram cepas halotolerantes que mostraram distinta capacidade descolorativa com corantes²⁸ comerciais em *SBR*. As cepas do gene *Halomonas* foram testadas em concentrações de NaCl de 0-25% m.v⁻¹, operando de maneira satisfatória em amplas faixas de temperatura (25-40 °C) e pH (5-11), em 4 dias de incubação, com concentrações de até 5 g.L⁻¹ de corante. Fan (2013), também estudando gene *Halomonas*, atestaram a resiliência dos microrganismos para outros tipos de sais (KCl, KI, NH₄Cl, CaCl₂, Na₂SO₄, NH₄(SO₄), NaNO₃, K₂SO₄ e Ca₃(PO₄)₂) sob elevadas concentrações, na descoloração do corante AO7. A concentração dos sais variou de 50 a 1.000 mg.L⁻¹. Todos os sais aparentaram exercer pouco ou nenhum efeito sobre a descoloração ainda que sob choques de carga de até 100 g.L⁻¹.

²⁸ Remazol Black B, Maxilon Blue, Sulphonyl Scarlet BNLE, Sulphonyl Blue TLE, Sulphonyl Green BLE, Remazol Black N e Entrazol Blue IBC.

Carvalho et al. (2020), ao avaliarem a comunidade microbiana no tratamento de efluente têxtil contendo corante *DB22* em reator *UASB*, observaram que o aumento da concentração de NaCl promovia mudança na comunidade microbiana, excluindo espécies pouco tolerantes. Por exemplo, Zhang et al. (2010) mencionam crescimento de genes de bactérias em reatores de pH alcalino que convertem carboidratos principalmente a acetato, cujo crescimento é dependente de íons Na^+ . O aumento gradual da carga de sais parece ter evitado efeito inibitório na biomassa (PUNZI et al., 2015). A concentração de NaCl, neste trabalho, permaneceu constante para toda operação ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$). Portanto, não foi possível avaliar a resiliência da biomassa em relação ao teor de sais, mas observar apenas que, na concentração proposta, ambos os reatores atingiram níveis elevados de remoção de cor.

5.8. Análise de diversidade por DGGE

5.8.1 Análise multivariada do perfil de banda

Amostras da biomassa de cada fase operacional dos reatores foram coletadas para análise do material celular, com amplificação por PCR das regiões V6-V8 do rDNA 16S. A técnica de DGGE como ferramenta molecular complementa a interpretação dos dados físico-químicos até aqui apresentados, avaliando a diversidade biológica durante a operação, em cada reator, com objetivo específico de remoção de cor. A Figura 38 mostra o resultado do ensaio de DGGE nas amostras coletadas durante a operação, nos reatores alfanumericamente referenciados, para melhor discutir aspectos específicos das bandas de comunidades microbianas. As amostras estão nomeadas de acordo com o reator ao qual a amostra pertence, seguido do número que representa a fase em que foi coletada (Ex: RA2 corresponde à coleta do reator RA em PII).

Figura 38 – Bandas de DGGE para o domínio *Bacteria* classificados alfanumericamente.

Fonte: Autor.

A amostra ‘RAS’ corresponde à biomassa suspensa coletada no reator RA durante PI e não apresentou diferenças significativas em relação à ‘RA1’. Comparando ‘RA1’ e ‘RAS’, observa-se que não houve diferença significativa entre a biomassa suspensa e aderida nesse reator, embora algumas comunidades tenham apresentado, aparentemente, maior resiliência devido ao crescimento em meio suporte. A amostra de DNA coletada de ‘RS1’ não pôde ser analisada. No perfil de bandas do DGGE, é possível observar variações na estrutura das comunidades microbianas, tanto quanto às configurações de reatores estudadas, quanto em relação às variações de TDH as quais foram submetidas. No entanto, algumas populações se mantiveram presentes em ambos os reatores, durante todos os períodos operacionais.

Na Figura 38, é possível observar comunidades que inicialmente estiveram presentes, e que foram sendo menos expressivas no decorrer da operação, como pode ser visto em A1, C1, E1 e G1 para RA e D1, F1 e H1 para RS. Semelhantemente, a banda C2 de RA foi sendo menos presente no decorrer da operação, observado em E2 e G2. A mesma banda, já pouco expressiva em RS (D2), tornou-se ausente em F2 e H2. O desaparecimento dessas comunidades ocorreu paralelamente à redução de eficiência de remoção de cor, o que pode significar que se tratavam de espécies envolvidas no processo. Por outro lado, a banda pouco aparente na posição A2 em RA, foi se tornando mais presente nas fases seguintes, como pode ser visto em C3, E3 e G3. A proliferação dessa comunidade, em RA, pode estar relacionada com a resiliência à toxicidade resultante da redução do TDH, que resultou no aumento da remoção de DQO, ao longo da operação. Em A3, C4, E5 e G4, é possível notar uma banda que aparece com maior intensidade de forma intermitente, no decorrer das fases de RA, sendo que o mesmo acontece em RS, como

é visto em D3, F3 e H4. Comunidades como as observadas nas linhas A0 e A4 estiveram presentes durante toda a operação para os dois reatores. A Figura 39 mostra o dendograma das amostras com percentuais de similaridades destacados.

Figura 39 – Gel e dendograma das amostras coletadas durante o período experimental.

Fonte: Autor.

Verifica-se que o nível de similaridade entre as comunidades microbianas variou de 53% a 84,2%. O menor nível de similaridade é observado na divisão entre os grupos de fases [PI, PII] e [PIII, PIV], com similaridade de 53%. Assim, o TDH de 12 horas estabeleceu o maior impacto observado nas populações microbianas neste estudo, em ambos os reatores.

Analisando a transição de PIII para PIV, observa-se que RA teve 71,5% de similaridade em relação à fase anterior, enquanto que RS teve apenas 67%. Estas variações nos níveis de semelhança entre as comunidades podem indicar que há maior suscetibilidade às variações do ambiente nas populações presentes em RS do que em RA. O resultado confirma o conceito de que se espera maior resiliência a tóxicos em comunidades estabelecidas em meio suporte. A ausência da amostra RS1 compromete melhor embasamento do argumento.

Comparando os resultados obtidos em uma mesma fase operacional, o menor nível de similaridade ocorreu também em PIII, com 67% de paridade entre as comunidades. O maior nível de similaridade entre reatores, nas mesmas condições, ocorreu em PIV. Acredita-se que a carga elevada tenha exercido maior grau de seletividade das espécies nos reatores. Não obstante, nesta fase ocorreu a maior diferença de eficiência de remoção de cor entre os reatores, equivalente a aproximadamente 22,8%. A situação sugere que as modificações nas populações das comunidades microbianas ocorridas não necessariamente afetaram as principais comunidades responsáveis pela remoção de cor nos reatores.

5.8.2 Índices ecológicos

Os índices de diversidade (Shannon - H), riqueza (Chao) e dominância (D) foram calculados a partir do perfil de bandas do *DGGE* por curvas densitométricas, utilizando o software *Past*®. A Tabela 13 dispõe sobre os valores destes índices, associados às remoções de cor e DQO obtidas em determinado período.

Tabela 13 – Índices ecológicos de diversidade (Shannon), dominância (D) e riqueza (Chao) em cada reator durante o experimento e eficiências associadas de remoção de cor e DQO.

Amostra	Descoloração média (%)	DQO removida média (%)	Chao	Shannon	Dominância
RA1	86,22%	24,24%	18	2,588	0,0879
RA2	82,88%	22,25%	19	2,774	0,0693
RS2	78,42%	22,92%	18	2,703	0,0751
RA3	75,01%	32,00%	22	2,944	0,0593
RS3	73,51%	25,99%	22	2,800	0,0766
RA4	80,80%	51,70%	22	2,842	0,0697
RS4	57,99%	19,03%	18	2,681	0,0789

Fonte: Autor.

O índice de diversidade considera o número de populações observados para cada amostra. O índice representa o grau de incerteza de identidade de um determinado táxon dentro da amostra, contemplando a abundância relativa de diferentes populações. O índice Chao é um método não-paramétrico para estimar o número de populações contidas na amostra. Já o índice de dominância indica a preponderância de uma população, em relação às demais, dentro da amostra, *i.e.*, reflete a probabilidade de escolher ao acaso dois indivíduos que pertençam à mesma espécie na amostra. O índice varia de 0 a 1 e aumenta conforme a diversidade da amostra diminui (KIM et al., 2017; MORRIS et al., 2014).

Em todas os períodos de operação o índice de diversidade foi maior no reator RA e o índice de dominância foi maior em RS. É razoável deduzir que o desenvolvimento da biomassa em meio suporte permitiu a proliferação comunidades microbianas mais sensíveis e que puderam beneficiar-se do crescimento em sinergia no biofilme. Assim, a abundância relativa foi mais bem distribuída em relação ao reator de crescimento suspenso RS, onde algumas comunidades foram mais dominantes.

Para melhor observação da relação entre os índices ecológicos calculados e os resultados da operação, a Figura 40 ilustra os índices de dominância (D) e diversidade (H') relacionados com eficiências de remoção de cor e DQO obtidos.

Figura 40 – Relação entre índices de diversidade (A) e dominância (B) e eficiência em remoção de cor DQO.

Fonte: Autor.

Observa-se que a diversidade do consórcio não sofreu mudanças significativas em nenhuma condição operacional, variando entre 2,59 a 2,94. Apesar disso, a abundância dessas populações pode ter sido relevante nos resultados físico-químicos. Houve aumento consistente na diversidade das comunidades nos reatores com pico em PIII, possivelmente fruto do menor tempo de contato dos subprodutos tóxicos de degradação do corante (aminas aromáticas) no decorrer da operação, que resultou em possível atividade metanogênica e aumento de remoção de DQO em RA. O pico do índice de dominância em PI corrobora com a hipótese de que, nesta fase, predominaram espécies mais adaptadas à toxicidade destes metabólitos de degradação, como observado no estudo de Silva et al. (2014). Apesar do acúmulo de sulfetos em RS durante PIV, não houve mudanças significativas na comunidade microbiana, o que indica a ocorrência apenas de inibição temporária na rota metabólica de remoção do composto.

O índice de dominância teve pico em RA em PI e mínimo em PIII, nos quais foram registradas as médias máximas e mínimas de remoção de cor, respectivamente. Há, então, uma correlação entre a abundância relativa de táxons do consórcio e a eficiência de remoção de cor, indicando que a maior abundância relativa entre as espécies do consórcio foi benéfica à descoloração redutiva. Para RS, no entanto, a relação é oposta, uma vez que o gradativo aumento no índice de dominância foi acompanhado por reduções na eficiência média de remoção de cor. A relação inversa entre aumento do índice de dominância e eficiência remoção de cor em RA e RS sugere que o meio de cada reator favoreceu o crescimento e predominância de diferentes comunidades microbianas. Essas diferentes comunidades não necessariamente estiveram ligadas aos processos de descoloração redutiva.

5.9. Sólidos e quantificação de biomassa aderida

A concentração de sólidos suspensos foi determinada semanalmente, durante o período experimental, nos efluentes dos reatores, para verificar a retenção celular em cada reator. A Tabela 14 resume os resultados médios obtidos para concentrações de sólidos suspensos totais, fixos e voláteis.

Tabela 14 – Concentração média de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV).

Reator	Fases operacionais	SST	SSF mg.L ⁻¹	SSV
RA	PI	66,00 ± 10,16	24,78 ± 4,67	41,22 ± 8,34
	PII	43,33 ± 3,06	9,33 ± 1,15	34,00 ± 3,46
	PIII	64,00 ± 9,17	8,00 ± 2,00	56,00 ± 8,00
	PIV	45,75 ± 1,71	15,25 ± 3,77	30,50 ± 2,52
RS	PI	34,33 ± 4,51	9,67 ± 2,08	24,67 ± 5,51
	PII	76,00 ± 8,72	9,67 ± 1,53	66,33 ± 10,21
	PIII	82,33 ± 15,95	25,33 ± 8,50	57,00 ± 16,09
	PIV	70,67 ± 5,77	7,33 ± 1,15	63,33 ± 4,62

Fonte: Autor.

Os resultados mostram que ambas as configurações de reatores permitiram elevada retenção celular, considerando os baixos valores médios de SSV nos efluentes dos reatores. Entretanto, observa-se que o aumento de vazão, ocorrido no decorrer das fases, acarretou em maior lavagem de biomassa em RS, exercendo forte pressão seletiva na biomassa mais eficiente na remoção de DQO. É possível que essa biomassa fosse predominantemente pertencente ao grupo das BRS, visto que houve concomitantemente a diminuição na eficiência de remoção do íon sulfato ([Tópico 5.6.1](#)).

Ao final da operação, a biomassa retirada das espumas foi separada e medida para determinar a concentração de sólidos, obtendo-se o valor de 6,78 mgSTV.cm⁻³ de espuma. Considerando que a espuma utilizada possui 0,0222 g.cm⁻³, a relação final entre as massas de espuma e biomassa é de 0,305 gSTV.gEspuma⁻¹. Oliveira (2016) inoculou reator com matrizes cúbicas de espuma de poliuretano e obteve concentração de 0,52gSSV.gEspuma⁻¹. A variação do resultado pode estar atrelada ao tratamento experimental que é aplicado. Outra possível

interferente teria sido o arraste de biomassa devido à elevada vazão aplicada em PIV. Também, segundo Chou et al. (2008), maiores valores na relação DQO/SO_4^{2-} resultam na formação de biofilmes mais compactos.

6. CONCLUSÕES

O reator de leito estruturado (RA) desempenhou de forma superior em relação ao reator de crescimento livre (RS) na remoção de cor e DQO no tratamento do efluente têxtil com corante *Direct Black 22*, utilizando consórcio microbiano adaptado. O resultado ratifica a superioridade de comunidades estabelecidas em biofilmes em relação às comunidades livres, conforme já abordado na literatura. Entre os fatores responsáveis pelo resultado no reator estão a mitigação de efeitos de toxicidade às comunidades mais sensíveis e atividade sinérgica entre comunidades próximas no biofilme para promover a degradação de compostos complexos, como os corantes azo.

O acúmulo de metabólitos do corante azo durante todas as fases operacionais dos reatores, apesar da eficiência na descoloração, reforça a insuficiência do tratamento unicamente anaeróbio para esta finalidade. Portanto, faz-se necessário o pós-tratamento aeróbio visando a mineralização de aminas aromáticas tóxicas, resultantes da degradação incompleta da molécula de corante azo.

O aumento da carga orgânica volumétrica não afetou significativamente o desempenho da biomassa. Contudo, com a diminuição do TDH, houve o aumento da carga de corante e também o encurtamento do tempo de exposição do consórcio microbiano aos metabólitos de degradação. Isso evidenciou a vantagem adaptativa da biomassa desenvolvida no reator RA, que aumentou a remoção de DQO em virtude da maior proteção às comunidades provida pela estrutura do biofilme.

A remoção de sulfatos ocorreu paralelamente à descoloração em ambos os reatores e leva a crer que não houve inibição competitiva entre os microrganismos envolvidos. Portanto, a concentração do cossubstrato de 1 g.L^{-1} , com relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ média de 3,57, foi suficiente para manutenção dos níveis de eficiência tratamento. A remoção de sulfatos foi semelhante nos reatores e não sofreu impacto diante das mudanças no TDH.

O rendimento positivo para redução de cor obtido sob pH afluente médio de 9,87 indicou a presença de microrganismos alcalifílicos capazes de promover descoloração redutiva, no consórcio microbiano. Tais microrganismos são mais resistentes à inibição por sais e podem ser especialmente úteis no tratamento de efluentes têxteis com pH elevado, evitando o consumo de reagentes para regulação de pH em etapas de pré-tratamento.

A concentração de sulfetos na corrente efluente foi baixa na maior parte da operação, quando comparado ao teoricamente previsto, considerando a concentração de sulfatos removida. A análise de material residual, acumulado em regiões específicas dos reatores,

mostrou a presença de enxofre elementar, composto esse normalmente encontrado em regiões micro-aeradas de reatores em que ocorre a sulfetogênese. Alternativamente, ao observar a queda de eficiência média de remoção de cor, no mesmo reator em que ocorreu abrupto aumento na concentração de sulfetos, inferiu-se sobre a possibilidade de participação de sulfetos como doadores de elétrons no resultado da descoloração final. De acordo com os dados obtidos, a ação do composto para este fim, embora não tenha sido precisamente avaliada, parece ter sido diminuta.

As varreduras no espectro luminoso mostraram consistentemente a formação de picos de absorbância na região UV, resultantes da formação de aminas aromáticas que não puderam ser degradadas, nas condições operacionais mantidas. Os reatores tiveram pico de eficiência com TDH de 24 horas, com $86,22 \pm 1,81\%$ e $79,64 \pm 1,61\%$ em RA e RS, respectivamente, e ambos sofreram pouco impacto com a diminuição do TDH. Os resultados sugerem que RA não só alcançou níveis superiores de remoção de cor em toda operação como, também, demonstrou ser mais resistente a efeitos de toxicidade do efluente têxtil e metabólitos de degradação.

A análise de DGGE forneceu complemento às considerações dos resultados físico-químicos. Os resultados mostram que RA estabeleceu maior diversidade de espécies, ratificando a vantagem das relações de sinergia entre comunidades próximas estabelecidas em biofilme, na degradação de compostos complexos, tais como os corantes azo. O sequenciamento do material celular poderá elucidar questões específicas acerca de quais espécies foram determinantes para a obtenção dos melhores resultados.

Considerando o exposto, conclui-se que os reatores foram capazes tratar o efluente têxtil na concentração proposta (0,03 mM) na presença de sais e sulfatos, alcançando bom nível de remoção de cor, fazendo uso da glicose como doador de elétrons. Apesar de terem resultados semelhantes para as condições avaliadas, o reator RA demonstrou sempre superioridade durante todas as fases operacionais, especialmente por manter a estabilidade nas situações de maior estresse e exposição a compostos tóxicos. O efluente oriundo do tratamento é, ainda, rico em aminas aromáticas tóxicas e requer o pós-tratamento para alcançar níveis aceitáveis para descarte.

REFERÊNCIAS

- ABIT. **Perfil do setor**. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 12 set. 2019.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 07, p. 406–414, 2014.
- AFTAB, U. et al. Decolourization and degradation of textile azo dyes by corynebacterium sp. Isolated from industrial effluent. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 43, n. 1, p. 1–8, 2011.
- ALBUQUERQUE, M. G. E. et al. Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5–6, p. 790–799, 2005.
- ALI, N.; HAMEED, A.; AHMED, S. Physicochemical characterization and Bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous Bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 1, p. 322–328, 2009.
- ALI, S. et al. Integrated desizing-bleaching-reactive dyeing process for cotton towel using glucose oxidase enzyme. **Journal of Cleaner Production**, v. 66, p. 562–567, 2014.
- ALMEIDA, E. J. R. DE; DILARRI, G.; CORSO, C. R. A indústria têxtil no Brasil: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. p. 18, 2016.
- AMARAL, F. M. et al. Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 364–369, 2014.
- AMARAL, F. M. et al. Hydraulic retention time influence on azo dye and sulfate removal during the sequential anaerobic-aerobic treatment of real textile wastewater. **Water Science and Technology**, v. 76, n. 12, p. 3319–3327, 2017.
- AMOOZEGAR, M. A. et al. Azo dye decolorization by halophilic and halotolerant microorganisms. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 217–230, 2011.
- AMORIM, S. M. et al. Influence of redox mediators and electron donors on the anaerobic removal of color and chemical oxygen demand from textile effluent. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 41, n. 9, p. 928–933, 2013.
- ANJANEYULU, Y.; SREEDHARA CHARY, N.; SAMUEL SUMAN RAJ, D. Decolourization of industrial effluents - Available methods and emerging technologies - A review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 245–273, 2005.
- AOYAGI, T. et al. Hydraulic retention time and pH affect the performance and microbial communities of passive bioreactors for treatment of acid mine drainage. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Federation**. 20. ed. Washington DC: American Water Works Association and Water Environment Federation, 2005.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**.

22. ed. Washington DC: American Water Works Association and Water Environment Federation, 2012.

AQUINO, S. F. DE; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152–161, 2005.

ARAÚJO, S. P. **Tratamento biológico de efluente têxtil com alto teor de sulfato e de salinidade**. Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

ASAD, S. et al. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2082–2088, 2007.

BARDI, L.; MARZONA, M. Factors Affecting the Complete Mineralization of Azo Dyes. **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 5, n. Part N, p. 1–12, 2010.

BATTAN, B.; SHARMA, J. Eco-friendly Microbial Decolorization and Detoxification of Reactive dyes by Isolated Three Culture of Bacillus sp. **International Journal of Engineering, Science and Mathematics**, v. 7, n. 3, p. 330–340, 2018.

BERTOLINO, S. M. et al. Implications of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. **Journal of Environmental Management**, v. 103, p. 15–23, 2012.

BISSCHOPS, I.; SPANJERS, H. Literature review on textile wastewater characterisation. v. 24, p. 1399–1411, 2003.

BOONCHAYAANANT, B. et al. Sulfate Supplements Enhance the Decolorization of an Azo Dye Acid Red 18 in Anaerobic Baffled Reactors. v. 32, n. 4, p. 1045–1054, 2013.

BRAÚNA, C. H. DA C.; MOTA, S.; DOS SANTOS, A. B. Reductive decolorization of the azo dye RR2 in the absence and presence of redox mediator and the electrons acceptor nitrate. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 2, p. 275–284, 2009.

BUISMAN, C. J. N. et al. Optimization of Sulphur Production in a Biotechnological Sulphide-Removing Reactor. v. 35, p. 50–56, 1990.

CAMILOTI, P. R. et al. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, 2014.

CAO, J. et al. Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. **International Journal of Mineral Processing**, v. 106–109, p. 58–64, 2012.

CARMEN, Z.; DANIELA, S. Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview. In: PUZYN, D. T. (Ed.). **Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update**. Iasi: InTech, 2012.

CARVALHO, M. G. P. DE. **INTERFERÊNCIA DA PRESENÇA DE SULFATO SOBRE O TRATAMENTO DE EFLUENTE TÊXTEL SINTÉTICO EM REATORES UASB E COMPARTIMENTADO DE LEITO FIXO**. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

CARVALHO, J. R. S. et al. Microaerated UASB reactor treating textile wastewater: The core microbiome and removal of azo dye Direct Black 22. **Chemosphere**, v. 242, p. 125157, 2020.

CERVANTES, F. J. et al. Biogenic sulphide plays a major role on the riboflavin-mediated

decolourisation of azo dyes under sulphate-reducing conditions. **Chemosphere**, v. 68, n. 6, p. 1082–1089, 2007.

CERVANTES, F. J.; ENRIQUEZ, J. E.; FIELD, J. A. The role of sulphate reduction on the reductive decolorization of the azo dye reactive orange 14. p. 171–177, 2006.

CERVANTES, F. J.; SANTOS, A. B. D. Reduction of azo dyes by anaerobic bacteria: Microbiological and biochemical aspects. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 125–137, 2011.

CHANG, J. S. et al. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Research**, v. 35, n. 12, p. 2841–2850, 2001.

CHEN, H.; HOPPER, S. L.; CERNIGLIA, C. E. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein. **Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 1433–1441, 2005.

CHEN, K. C. et al. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 57–68, 2003.

CHEN, Y. et al. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. **Water Research**, v. 41, n. 3, p. 683–689, 2007.

CHINWETKITVANICH, S.; TUNTOOLVEST, M.; PANSWAD, T. Anaerobic decolorization of reactive dyebath effluents by a two-stage UASB system with tapioca as a co-substrate. **Water Research**, v. 34, n. 8, p. 2223–2232, 2000.

CHIRANJEEVI, P.; NARESH KUMAR, A.; VENKATA MOHAN, S. Critical assessment of biofilm and suspended growth reactor configurations for acidogenic biohydrogen production using wastewater as a function of redox microenvironment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 14, p. 7561–7571, 2014.

CHOU, H. H. et al. Competitive reaction kinetics of sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic filters. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8061–8067, 2008.

CINAR, Ö. et al. Effect of cycle time on biodegradation of azo dye in. v. 6, p. 455–460, 2008.

CIRIK, K.; KITIS, M.; CINAR, O. The effect of biological sulfate reduction on anaerobic color removal in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 5, p. 579–589, 2013.

CLARKE, E. A.; ANLIKER, R. Organic Dyes and Pigments. In: **Handbook of Environmental chemistry**. Springer Berlin, 1980. p. 181–215.

CNI - UNIDADE DE NEGÓCIOS INTERNACIONAIS - NEGINT. Serviços e competitividade industrial no brasil. p. 105, 2014.

CONMETRO, M. J. (PRESIDENTE DO. **Regulamento Técnico MERCOSUL - Eticagem de Produtos Têxteis** CONMETRO Resolução no. 02, 2008. Disponível em: <<https://t.co/g6qz6jxyFd>>

CUI, M. H. et al. Decolorization enhancement by optimizing azo dye loading rate in an anaerobic reactor. **RSC Advances**, v. 6, n. 55, p. 49995–50001, 2016.

D'SOUZA, D. T. et al. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3–4, p.

504–511, 2006.

DAI, R. et al. Inhibitory effect and mechanism of azo dyes on anaerobic methanogenic wastewater treatment: Can redox mediator remediate the inhibition? **Water Research**, v. 104, p. 408–417, 2016.

DAI, R. et al. Understanding azo dye anaerobic bio-decolorization with artificial redox mediator supplement: Considering the methane production. **Bioresource Technology**, v. 249, n. 4, p. 799–808, 2018.

DAVE, S. R.; PATEL, T. L.; TIPRE, D. R. Microbial degradation of synthetic dyes in wastewaters. **Environmental Science and Engineering (Subseries: Environmental Science)**, n. 9783319109411, p. iii–iv, 2015.

DAWKAR, V. V. et al. Decolorization and detoxification of sulphonated azo dye Red HE7B by *Bacillus* sp. VUS. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 909–916, 2010.

DELÉE, W. et al. Anaerobic treatment of textile effluents: A review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 323–335, 1998.

DESJARDINS, P. R.; CONKLIN, D. S. Microvolume quantitation of nucleic acids. **Current Protocols in Molecular Biology**, n. SUPPL.93, p. 1–16, 2011.

DOS SANTOS, A. B. **Reductive Decolourisation of Dyes by Thermophilic Anaerobic Granular Sludge**. Wageningen University, 2005.

DOS SANTOS, A. B. et al. The contribution of fermentative bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 38–46, 2006.

DOS SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Azo dye reduction by thermophilic anaerobic granular sludge, and the impact of the redox mediator anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) on the reductive biochemical transformation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 62–69, 2004.

DUBOIS, M. et al. A colorimetric method for the determination of sugars. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–35, 1956.

EL BOURAIE, M.; EL DIN, W. S. Biodegradation of Reactive Black 5 by *Aeromonas hydrophila* strain isolated from dye-contaminated textile wastewater. **Sustainable Environment Research**, v. 26, n. 5, p. 209–216, 2016.

FAHMI, F.; ABIDIN, C. Z. A.; RAHMAT, N. R. Multi-stage Ozonation and Biological Treatment for Removal of Azo Dye Industrial Effluent. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 1, n. 2, p. 193–198, 2010.

FAN, W. Characteristics of azo dye decolorization in saline solutions by a halotolerant strain and effect of various salts. **Proceedings - 2013 4th International Conference on Digital Manufacturing and Automation, ICDMA 2013**, p. 339–343, 2013.

FERRAZ, A. D. N. et al. Textile effluent treatment in a UASB reactor followed by submerged aerated biofiltration. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 8, p. 1581–1589, 2011.

FIRMINO, P. I. M. et al. Colour removal of dyes from synthetic and real textile wastewaters in one- and two-stage anaerobic systems. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7773–7779, 2010.

FLORENCIO, T. D. M. Degradação anaeróbia de efluente têxtil simulado com corante azo Direct Black 22 na presença de íons sulfato em reator anaeróbio de leito estruturado com fluxo ascendente. p. 160, 2018.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. **Environment International**, v. 30, n. 7, p. 953–971, 2004.

FORSS, J.; WELANDER, U. Decolourization of reactive azo dyes with microorganisms growing on soft wood chips. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 752–758, 2009.

FORSS, J.; WELANDER, U. Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 227–237, 2011.

FRANCISCON, E. et al. Microaerophilic-aerobic sequential decolourization/biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Klebsiella* sp. strain VN-31. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 446–452, 2009.

FRANCISCON, E. et al. Potential of a bacterial consortium to degrade azo dye Disperse Red 1 in a pilot scale anaerobic-aerobic reactor. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 5, p. 816–825, 2015.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 251–262, 2001.

G. LETTINGA. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 1964, p. 3–28, 1995.

GADOW, S. I.; LI, Y. Y. Development of an integrated anaerobic/aerobic bioreactor for biodegradation of recalcitrant azo dye and bioenergy recovery: HRT effects and functional resilience. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, n. January, p. 100388, 2020.

GALAI, S.; LIMAM, F.; MARZOUKI, M. N. Decolorization of an industrial effluent by free and immobilized cells of *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56. Implementation of efficient down flow column reactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1341–1347, 2010.

GAO, S. et al. Evaluation of the Damage by Dyestuffs and NaCl on *Phanerochaete chrysosporium*. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 29, n. 4, p. 428–434, 2010.

GAVAZZA, S.; GUZMAN, J. J. L.; ANGENENT, L. T. Electrolysis within anaerobic bioreactors stimulates breakdown of toxic products from azo dye treatment. **Biodegradation**, v. 26, n. 2, p. 151–160, 2015.

GHALY, A. E. et al. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 05, n. 01, p. 1–18, 2013.

GODOI, L. A. G. DE et al. Rapid and easy quantification of elemental sulphur in aqueous samples from biological reactors: the turbidimetric method revisited. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, n. 9, p. 809–823, 2019.

GOTTLIEB, A. et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 49–56, 2003.

GUADIE, A. et al. Biodecolorization of textile azo dye using *Bacillus* sp. strain CH12

isolated from alkaline lake. **Biotechnology Reports**, v. 15, n. October 2016, p. 92–100, 2017.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, V. B. Fixação do Corante A forma de fixação da molécula do corante a essas fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 1999.

GURULAKSHMI, M.; SUDAR, D. N. P.; VENBA, R. M. Biodegradation of leather acid dye by *Bacillus subtilis*. **Advanced Biotech**, p. 12–19, 2008.

HAANDEL, A. VAN; LETTINGA, G.; GATZE, F. **Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente**. Campina Grande: Epgraf, 1994.

HAN, Y. et al. Azo dye biodecolorization enhanced by *Echinodontium taxodii* cultured with lignin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

HARB, M. et al. Differences in microbial communities and performance between suspended and attached growth anaerobic membrane bioreactors treating synthetic municipal wastewater. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 1, n. 6, p. 800–813, 2015.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 585–602, 1986.

HART, M. G. R. A turbidimetric method for determining elemental sulphur. **The Analyst**, v. 86, n. 1024, p. 472–475, 1961.

HOUSE, M. W.; WEISS, W. J. Review of microbially induced corrosion and comments on needs related to testing procedures. **Proceedings of the 4th International Conference on the Durability of Concrete Structures, ICDCS 2014**, n. July, p. 94–103, 2014.

HU, T. L. Removal of reactive dyes from aqueous solution by different bacterial genera. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 10 pt 6, p. 89–95, 1996.

HU, Y. et al. Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. **Chemosphere**, v. 130, p. 24–33, 2015.

HUANG, J. et al. Enhanced azo dye removal in a continuously operated up-flow anaerobic filter packed with henna plant biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v. 299, p. 158–164, 2015.

HUSSAIN, S. et al. Biodecolorization of reactive black-5 by a metal and salt tolerant bacterial strain *Pseudomonas* sp. RA20 isolated from Paharang drain effluents in Pakistan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 331–338, 2013.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 93, p. 9–38, 2010.

IMRAN, M. et al. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 73–92, 2014.

ISIK, M. Efficiency of simulated textile wastewater decolorization process based on the methanogenic activity of upflow anaerobic sludge blanket reactor in salt inhibition condition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 5, p. 399–404, 2004.

JADHAV, J. P. et al. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. **Bioresource**

Technology, v. 101, n. 1, p. 165–173, 2010.

JONSTRUP, M. et al. Sequential anaerobic-aerobic treatment of azo dyes: Decolourisation and amine degradability. **Desalination**, v. 280, n. 1–3, p. 339–346, 2011.

KABRA, A. N.; KHANDARE, R. V.; GOVINDWAR, S. P. Development of a bioreactor for remediation of textile effluent and dye mixture: A plant-bacterial synergistic strategy. **Water Research**, v. 47, n. 3, p. 1035–1048, 2013.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; CROWLEY, D. Bioaugmentation of Azo Dyes. **Env Chem**, v. 9, n. Part N, p. 1–12, 2010.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; CROWLEY, D. E. Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 361–369, 2008.

KHAN, R.; BAANERJEE, U. C. Decolorization of Azo Dyes by Immobilized Bacteria. **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 9, n. Part N, p. 73–84, 2010.

KHELIFI, E. et al. Aerobic decolourization of the indigo dye-containing textile wastewater using continuous combined bioreactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 2, p. 683–689, 2008.

KHOUNI, I.; MARROT, B.; AMAR, R. BEN. Treatment of reconstituted textile wastewater containing a reactive dye in an aerobic sequencing batch reactor using a novel bacterial consortium. **Separation and Purification Technology**, v. 87, p. 110–119, 2012.

KIM, B. R. et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 2017.

KIM, S. Y.; AN, J. Y.; KIM, B. W. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. **Dyes and Pigments**, v. 76, n. 1, p. 256–263, 2008.

KOUA, D. et al. PeroxiBase: A database with new tools for peroxidase family classification. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 261–266, 2009.

KUMAR, A. N.; REDDY, C. N.; MOHAN, S. V. Biomineralization of azo dye bearing wastewater in periodic discontinuous batch reactor: Effect of microaerophilic conditions on treatment efficiency. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 56–64, 2015.

KURADE, M. B. et al. Decolorization of textile industry effluent containing disperse dye Scarlet RR by a newly developed bacterial-yeast consortium BL-GG. **Chemical Engineering Journal**, v. 184, p. 33–41, 2012.

LALNUNHLIMI, S.; VEENAGAYATHRI, K. Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 39–46, 2016.

LENS, P. et al. Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 311–325, 2002.

LENS, P. N. L. et al. Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher

Ltda, 1980.

LI, T.; GUTHRIE, J. T. Colour removal from aqueous solutions of metal-complex azo dyes using bacterial cells of *Shewanella* strain J18 143. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4291–4295, 2010.

LI, Y. et al. Enhanced anaerobic fermentation with azo dye as electron acceptor: simultaneous acceleration of organics decomposition and azo decolorization. **Journal of environmental sciences (China)**, v. 26, n. 10, p. 1970–1976, 2014.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 452–463, 2007.

LIER, J. B. VAN; MAHMOUD, N.; ZEEMAN, G. Anaerobic Wastewater Treatment. In: M. HENZE, M.C.M. VAN LOOSDRECHT, G. A. E. E D. B. (Ed.). **Biological Wastewater Treatment: Principles Modelling and Design**. London: IWA Publishing, 2008. p. 401–442.

LU, X.; LIU, R. Treatment of Azo Dye-Containing Wastewater Using Integrated Processes. **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 9, n. Part N, p. 133–150, 2010.

MANU, B.; CHAUDHARI, S. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. **Acta Horticulturae**, v. 82, p. 225–231, 2002.

MANU, B.; CHAUDHARI, S. Decolorization of indigo and azo dyes in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1213–1221, 2003.

MARCHANT, R. Selection System of a Substratum for Composing Biofilm of a Textile-Effluent. v. 17, n. 9, p. 993–996, 1995.

MCCARTY, P. L. Energetics and bacterial growth in organic compounds in aquatic environments. **Faust, S. D. e Hunter, J. V. New York, Marcel Dekker Inc.**, p. 495–531, 1971.

MENEZES, O. L. M. P. F. DE. **INFLUÊNCIA DA MICROAERAÇÃO DESCONTÍNUA SOBRE A REMOÇÃO DE COR E MATÉRIA ORGÂNICA DE EFLUENTES CONTENDO CORANTE AZO**. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

MISAL, S. A.; GAWAI, K. R. Azoreductase: a key player of xenobiotic metabolism. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, 2018.

MOCKAITIS, G. et al. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, 2014.

MOHAMMAD, S.; AZEEZ, A. HPLC Determination of Four Textile Dyes and Studying Their Degradation Using Spectrophotometric Technique. **An-Najah National University Faculty Of Graduate Studies**, p. 1–110, 2005.

MOHANA, S. et al. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 562–569, 2008.

MOHANTY, S.; DAFALE, N.; RAO, N. N. Microbial decolorization of reactive black-5 in a two-stage anaerobic-aerobic reactor using acclimatized activated textile sludge. **Biodegradation**, v. 17, n. 5, p. 403–413, 2006.

- MOLINARI, R. et al. Photocatalytic degradation of dyes by using a membrane reactor. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 43, n. 9, p. 1103–1114, 2004.
- MORRIS, E. K. et al. Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 18, p. 3514–3524, 2014.
- MOSTAFA, A. et al. Biological H₂ potential harvested from complex gelatinaceous wastewater via attached versus suspended growth culture anaerobes. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 9–18, 2017.
- MUKHERJEE, S. et al. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 61–73, 2013.
- MURALI, V. et al. Evaluation of integrated anaerobic-aerobic biofilm reactor for degradation of azo dye methyl orange. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 104–111, 2013.
- MUTAMBANENGWE, C. C. Z.; TOGO, C. A.; WHITELEY, C. G. Decolorization and degradation of textile dyes with biosulfidogenic hydrogenases. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 5, p. 1095–1100, 2007.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **20th AIAA International Communication Satellite Systems Co**, v. nference a, p. 127–141, 2002.
- MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 2008.
- NICOLAS, J. et al. BROWNING | Enzymatic – Biochemical Aspects. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 678–686, 2003.
- NÜBEL, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5636–5643, 1996.
- O'NEILL, C. et al. Colour in textile effluents - Sources, measurement, discharge consents and simulation: A review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 11, p. 1009–1018, 1999a.
- O'NEILL, C. et al. Anaerobic and aerobic treatment of a simulated textile effluent. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 74, n. 10, p. 993–999, 1999b.
- OLIVEIRA, G. H. D. DE. Remoção de sulfametazina em reatores anaeróbios tratando água residuária de suinocultura. p. 197, 2016.
- OLIVEIRA, J. M. S. **APLICAÇÃO DE AERAÇÃO INTERMITENTE PARA A DEGRADAÇÃO DE CORANTE AZO POR CONSÓRCIO MICROBIANO OBTIDO DE FLORESTAS TROPICAIS**. Universidade de São Paulo, 2019.
- OLIVEIRA, J. M. S. et al. Intermittent aeration strategy for azo dye biodegradation: A

suitable alternative to conventional biological treatments? **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, 2020.

OLIVIERI, G.; DONATO, A. DI; MARZOCHELLA, A. Bioreactors for Azo-Dye Conversion. **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 9, n. Part N, p. 101–131, 2010.

OMIL, F. et al. Long-term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 6, p. 676–685, 1998.

OZDEMIR, S. et al. Treatment of azo dye-containing synthetic textile dye effluent using sulfidogenic anaerobic baffled reactor. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 135–143, 2013.

ÖZKAN, B. Ç. et al. Accurate and sensitive determination of harmful aromatic amine products of azo dyes in wastewater and textile samples by GC–MS after multivariate optimization of binary solvent dispersive liquid-liquid microextraction. **Microchemical Journal**, v. 145, n. September 2018, p. 84–89, 2019.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 73–84, 2007.

PARMAR, N. D.; SHUKLA, S. R. Decolourization of dye wastewater by microbial methods - A review. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 25, n. May 2016, p. 315–323, 2017.

PEARCE, C. I.; LLOYD, J. R.; GUTHRIE, J. T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: A review. **Dyes and Pigments**, v. 58, n. 3, p. 179–196, 2003.

PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: Status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, n. 2, p. 121–139, 2004.

POKORNA, D.; ZABRANSKA, J. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1246–1259, 2015.

PRATO-GARCIA, D.; CERVANTES, F. J.; BUITRÓN, G. Azo dye decolorization assisted by chemical and biogenic sulfide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250–251, p. 462–468, 2013.

PUNZI, M. et al. Degradation of a textile azo dye using biological treatment followed by photo-Fenton oxidation: Evaluation of toxicity and microbial community structure. **Chemical Engineering Journal**, v. 270, p. 290–299, 2015.

QUEIROZ, M. T. A. et al. Gestão De Resíduos Na Indústria Têxtil E Sua Relação Com a Qualidade Da Água : Estudo De Caso. **Revista Iberoamericana de Engenharia Industrial**, v. 8, n. 15, p. 114–135, 2016.

RAI, H. S. et al. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with reference to biological treatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 219–238, 2005.

RAMACHANDRAN, P. et al. Potential process implicated in bioremediation of textile effluents: A review. **Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research**, v. 4, n. 1, p. 131–145, 2013.

RASOOL, K.; MAHMOUD, K. A.; LEE, D. S. Influence of co-substrate on textile wastewater treatment and microbial community changes in the anaerobic biological sulfate

reduction process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 299, p. 453–461, 2015.

RASOOL, K.; SHAHZAD, A.; LEE, D. S. Exploring the potential of anaerobic sulfate reduction process in treating sulfonated diazo dye: Microbial community analysis using bar-coded pyrosequencing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 641–649, 2016.

RASOOL, K.; WOO, S. H.; LEE, D. S. Simultaneous removal of COD and Direct Red 80 in a mixed anaerobic sulfate-reducing bacteria culture. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 611–616, 2013.

RAWAT, D.; MISHRA, V.; SHARMA, R. S. Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes. **Chemosphere**, v. 155, p. 591–605, 2016.

RIEGER, P. G. et al. Xenobiotics in the environment: Present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 101–123, 2002.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent a critical review on current.pdf. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247–255, 2001.

RODRÍGUEZ COUTO, S. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 227–235, 2009.

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2 SPEC. ISS., p. 164–177, 2009.

SABA, B. et al. Reactive black-5 azo dye treatment in suspended and attach growth sequencing batch bioreactor using different co-substrates. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 556–562, 2013.

SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; VARESCHE, M. B. A. Phylogenetic characterization and quantification by most probable number of the microbial communities of biomass from the upflow anaerobic sludge blanket reactor under sulfidogenic conditions. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2019.

SANDHYA, S. Biodegradation of Azo Dyes Under Anaerobic Condition: Role of Azoreductase. **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 9, n. Part N, p. 39–57, 2010.

SANTOS, A. B. et al. Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 7, p. 942–951, 2003.

SANTOS, A. B. DOS; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2369–2385, 2007a.

SANTOS, A. B. DOS; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Impacto Dos Mediadores Redox Na Remoção De Cor De Corantes Azo E Antraquinônico Por Lodo Granular Anaeróbio Sob Condições Mesofílicas E Termofílicas. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 102–108, 2007b.

SARANRAJ, P.; MANIGANDAN, M. ENZYMES INVOLVED IN BACTERIAL DECOLOURIZATION AND DEGRADATION OF TEXTILE AZO DYES. **Indo – Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)**, v. 4, n. 1, p. 1369–1376, 2018.

SARATALE, R. G. et al. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review.

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 42, n. 1, p. 138–157, 2011.

SARAYU, K.; SANDHYA, S. Current technologies for biological treatment of textile wastewater-A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 3, p. 645–661, 2012.

SEN, S. K. et al. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 112–133, 2016.

SENAN, R. C.; ABRAHAM, T. E. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **Biodegradation**, v. 15, n. 4, p. 275–280, 2004.

SENTHIL KUMAR, P.; GUNASUNDARI, E. Sustainable Wet Processing—An Alternative Source for Detoxifying Supply Chain in Textiles. p. 37–60, 2018.

SHAH, K. Biodegradation of azo dye compounds. **International Research Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 5–13, 2014.

SHAMEY, R.; ZHAO, X. Modelling, simulation and control of textile dyeing. In: X (Ed.). . **Modelling and predicting textile behaviour**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2014. p. 322–359.

SHARMA, K. et al. Modeling the pH effect on sulfidogenesis in anaerobic sewer biofilm. **Water Research**, v. 49, p. 175–185, 2014.

SILVA, A. J. et al. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93–98, 2006.

SILVA, C. P. DA. Tratamento Anaeróbio De Efluente Têxtil: Toxicidade a Organismos Metanogênicos E Interferência Dos Íons Sulfato E Sulfeto No Processo De Descoloração. 2017.

SILVA, M. ERICK R. DA et al. Sequential Anaerobic / Aerobic Treatment of Dye-Containing Wastewaters : Colour and COD Removals , and Ecotoxicity Tests. p. 1057–1069, 2012.

SILVA, S. Q. et al. Microbial dynamics during azo dye degradation in a UASB reactor supplied with yeast extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1153–1160, 2014.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 21–31, 2015.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. **Recent Advances in Decolorization and Degradation of Dyes in Textile Effluent by Biological Approaches**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2019.

SOLÍS, M. et al. Microbial decolouration of azo dyes: A review. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1723–1748, 2012.

SOMASIRI, W. et al. Evaluation of the efficacy of upflow anaerobic sludge blanket reactor in removal of colour and reduction of COD in real textile wastewater. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3692–3699, 2008.

SPAGNI, A.; CASU, S.; GRILLI, S. Decolourisation of textile wastewater in a submerged anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 180–185, 2012.

SPONZA, D. T.; ISIK, M. Decolorization and azo dye degradation by anaerobic / aerobic sequential process. v. 31, p. 102–110, 2002.

SPONZA, D. T.; MUSTAFA, I. Reactor performances and fate of aromatic amines through decolorization of Direct Black 38 dye under anaerobic / aerobic sequential. v. 40, p. 35–44, 2005.

SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 10, p. 1915–1929, 2010.

SRIVASTAVA, M. P. et al. Microbial Biodegradation of Reactive Blue (RB) Textile azo dye in Sequential Anoxic/Aerobic Bioreactor. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 8, p. 1–6, 2013.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1–2, p. 69–80, 2001.

SUDHA, M. et al. Microbial degradation of Azo Dyes : A review Review Article Microbial degradation of Azo Dyes : A review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. January 2014, p. 670–690, 2018.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3–4, p. 130–137, 1999.

TELKE, A. A. et al. Influence of organic and inorganic compounds on oxidoreductive decolorization of sulfonated azo dye C.I. Reactive Orange 16. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 298–309, 2009.

TELKE, A. A. et al. Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. **Biodegradation**, v. 21, n. 2, p. 283–296, 2010.

THAKUR, J. K. et al. Degradation of sulphonated azo dye red HE7B by *Bacillus* sp. and elucidation of degradative pathways. **Current Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 183–191, 2014.

TONY, B. D.; GOYAL, D.; KHANNA, S. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 462–469, 2009.

TOPAÇ, F. O. et al. Effect of a sulfonated azo dye and sulfanilic acid on nitrogen transformation processes in soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2–3, p. 1006–1013, 2009.

VAN DER ZEE, F. P. **Anaerobic azo dye reduction**. Wageningen University, 2002.

VAN DER ZEE, F. P. et al. The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. **Water Research**, v. 37, n. 13, p. 3098–3109, 2003.

VAN DER ZEE, F. P.; CERVANTES, F. J. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 256–277, 2009.

VAN DER ZEE, F. P.; LETTINGA, G.; FIELD, J. A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. **Chemosphere**, v. 44, n. 5, p. 1169–1176, 2001.

VAN DER ZEE, F. P.; VILLAVERDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes

- A short review of bioreactor studies. **Water Research**, v. 39, n. 8, p. 1425–1440, 2005.
- VASQUEZ, Y. et al. Biochemical passive reactors for treatment of acid mine drainage: Effect of hydraulic retention time on changes in efficiency, composition of reactive mixture, and microbial activity. **Chemosphere**, v. 153, p. 244–253, 2016.
- VENKATA MOHAN, S. et al. Relative performance of biofilm configuration over suspended growth operation on azo dye based wastewater treatment in periodic discontinuous batch mode operation. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 424–433, 2013.
- VERMA, P.; MADAMWAR, D. Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 102–103, n. 2, p. 109–118, 2002.
- VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**.
- WAGHMODE, T. R. et al. A sequential aerobic/microaerophilic decolorization of sulfonated mono azo dye Golden Yellow HER by microbial consortium GG-BL. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 1024–1034, 2011.
- WALKER, R.; RYAN, A. J. Some molecular parameters influencing rate of reduction of azo compounds by intestinal microflora. **Xenobiotica**, v. 1, n. 4–5, p. 483–486, 1971.
- WANG, D. et al. Approach of describing dynamic production of volatile fatty acids from sludge alkaline fermentation. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 343–351, 2017.
- WU, J. Y. et al. Decolorization of azo dye in a FBR reactor using immobilized bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 102–112, 2005.
- YANG, Q. et al. Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 225–230, 2009.
- YASEEN, D. A.; SCHOLZ, M. **Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review**. Springer Berlin Heidelberg, 2019. v. 16
- YOO, E. S.; LIBRA, J.; WIESMANN, U. Reduction of azo dyes by *Desulfovibrio* desulfuricans. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 12, p. 15–22, 2000.
- YU, L. et al. Adsorption and decolorization kinetics of methyl orange by anaerobic sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 1119–1127, 2011.
- YUAN, H. et al. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 2025–2029, 2006.
- ZHANG, F. et al. Effects of dye additives on the ozonation process and oxidation by-products: A comparative study using hydrolyzed C.I. Reactive Red 120. **Dyes and Pigments**, v. 60, n. 1, p. 1–7, 2004.
- ZHANG, P. et al. Understanding short-chain fatty acids accumulation enhanced in waste activated sludge alkaline fermentation: Kinetics and microbiology. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 24, p. 9343–9348, 2010.
- ZHANG, P.; CHEN, Y.; ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. **Water**

Research, v. 43, n. 15, p. 3735–3742, 2009.

ZHAO, X.; HARDIN, I. R.; HWANG, H. M. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 57, n. 1, p. 1–6, 2006.

ZILLE, A.; TZANOV, T.; GUBITZ, G. M. Immobilized laccase for decolourization of RB5 dyeing effluent. **Biotechnol Lett**, v. 25, p. 1473–1477, 2004.

ZIMMERMANN, T.; KULLA, H. G.; LEISINGER, T. Properties of Purified Orange II Azoreductase, the Enzyme Initiating Azo Dye Degradation by *Pseudomonas* KF46. **European Journal of Biochemistry**, v. 129, n. 1, p. 197–203, 1982.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Superfície de absorbâncias obtida para afluente e efluentes dos reatores em PI.

APÊNDICE B – Superfície de absorbâncias obtida para afluente e efluentes dos reatores em PII.

APÊNDICE C – Superfície de absorbâncias obtida para afluyente e efluentes dos reatores em PIII.

APÊNDICE D – Superfície de absorbâncias obtida para afluente e efluentes dos reatores em PIV.