

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

JEAN MAIKON SANTOS OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE AERAÇÃO INTERMITENTE PARA A DEGRADAÇÃO DE CORANTE  
AZO POR CONSÓRCIO MICROBIANO OBTIDO DE FLORESTAS TROPICAIS

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos – SP

2019



JEAN MAIKON SANTOS OLIVEIRA

Aplicação de Aeração Intermitente para a Degradação de Corante Azo por Consórcio  
Microbiano obtido de Florestas Tropicais

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. Eugênio Foresti

São Carlos – SP

2019

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).

O48a Oliveira, Jean Maikon Santos  
Aplicação de aeração intermitente para a degradação de corante azo por consórcio microbiano obtido de florestas tropicais / Jean Maikon Santos Oliveira; orientador Eugênio Foresti. São Carlos, 2019.

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, 2019.

1. Direct Black 22. 2. Efluente têxtil. 3. Descoloração redutiva. 4. Aminas aromáticas. 5. Planejamento fatorial. 6. Ecotoxicidade. 7. Sequenciamento do gene 16S rRNA. 8. Diversidade microbiana. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **JEAN MAIKON SANTOS OLIVEIRA.**

Título da dissertação: "Aplicação de aeração intermitente para a degradação de corante azo por consórcio microbiano obtido de florestas tropicais".

Data da defesa: 01/03/2019.

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

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

APROVADO

Prof. Dr. **Dagoberto Yukio Okada**  
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

APROVADO

Prof. Dr. **Arnaldo Sarti**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

APROVADO

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Decano da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Humberto Breves Coda**



*Aos meus pais, Reinaldo e Salete*

*Ao meu irmão, Ruan*

*Ao Daniel*

*Dedico.*





## AGRADECIMENTOS

Imaginamos a vida como um caminho retilíneo e que, dentro de nossos ritmos, movemo-nos em direção a um ponto de chegada.

A primeira lição é que o caminho é sinuoso, e portanto a distância a percorrer é maior do que esperávamos.

A segunda lição é que nem sempre nos movemos. As pausas nos ajudam a recuperar o fôlego; e precisamos delas para seguir adiante.

Por fim, entendemos que não existe ponto de chegada.

Agradeço a todos que, de alguma maneira, aceitaram caminhar comigo neste pequeno meandro da vida:

Ao Prof. Dr. Eugênio Foresti, que aceitou me orientar neste caminho. Pelo apoio, confiança, ensinamentos e bom exemplo de professor e de pessoa.

À Profa. Dra. Márcia H. R. Z. Damianovic, que trouxe a temática de corantes azo ao LPB. Aproveito para agradecer aos demais professores do SHS que contribuíram à minha formação profissional.

À Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos, por suas contribuições relevantes ao estudo do tratamento biológico de efluentes têxteis no Brasil.

Aos técnicos do LPB, Eloísa Pozzi, Isabel K. Sakamoto, Carolina Sabatini, Maria Ângela Adorno e Fernando Moura, que, com profissionalismo, ajudaram-me na rotina de laboratório. Agradeço, também, aos demais profissionais do SHS/EESC: Sá, Priscila, Rose e Silvana.

Aos amigos do LPB:

- Alana Lima, Alejandra Villa, Bruno Garcia (Giz), Franciele Camargo, Henrique Dornelles, Jamille Carvalho, Marina Gomes, Natália Silveira, Raissa Mazareli e Williane Macedo; com quem aprendi e dividi grande parte da minha jornada em São Carlos, dentro e fora do LPB.

- Adriana Maluf, Carol Garcia, Carol Granatto, Diana Delgado, Elias Neto, Elis W. Nogueira, Fabrício Motteran, Felipe Eng, Ivo Gabriel, Guilherme Soares, Heitor Róger, Jaqueline Cardoso, Jenny Ventura, Liliane Folli, Laís Souza, Luana Grangeiro, Lucas Fuess, Maria E.

Simões, Mirabelle Cunha, Mirian Niz, Pamela Couto, Rafaela Carvalho, Renata Solcia, Rodrigo Carneiro, Thaila Florêncio e Thiago (Cebola); pela troca de aprendizado, companheirismo e lições cotidianas.

À Carina G. Issa e Mara Rúbia, que me ajudaram imensamente com os ensaios ecotoxicológicos. Agradeço, também, ao prof. Dr. Juliano Corbi, por ter cedido a infraestrutura, e aos demais membros do LEAA. Vocês são demais!

À Kamila S. Silva, com quem mantive contato apesar da distância que separa o LPB e o LATAR. Obrigado pela parceria, ajuda e cumplicidade nessa reta final do mestrado!

Aos demais amigos do SHS: Felipe Augusto, Gabriela Guerrize, Lidia Moura, Sandro Paiva, Raquel Lima e Schay Macário.

Aos amigos de longa data: Douglas Rodrigues, Gabriel Coelho, Iago Aliprandini, Jéssica Leal, Leonardo Cattani, Orlando Dadasio, Raisal Kacuta, Roberto Neto, Tarley Lima.

Aos meus familiares, que sempre acreditaram em mim.

À minha avó, Carmem, pelo carinho e amor infinitos; ao Ruan, pelo grande irmão que é; e à Milena, de quem tenho muito carinho.

Aos meus pais, Reinaldo e Salete, pelo apoio incondicional. Por terem me dado toda a estrutura necessária ao desenvolvimento e amadurecimento no tempo correto, instruindo-me com suas moral e caráter impecáveis. E por terem me permitido o que lhes foi negado, abrindo mão de muitas coisas para que eu nunca precisasse deixar de estudar. Vocês são pais exemplares.

Ao Daniel Colomer, pela paciência, suporte, carinho e por acreditar em mim.

À CAPES, pela bolsa de mestrado, e à FAPESP, pelo apoio concedido por meio do projeto temático (Processo N° 2015/06246-7).

**Obrigado!**

*O objetivo final da ciência é fornecer uma teoria  
única que descreva todo o universo*  
(Stephen Hawking, em *A Brief History of Time*)



## RESUMO

Oliveira, J.M.S. **Aplicação de aeração intermitente para a degradação de corante azo por consórcio microbiano obtido de florestas tropicais**. 2019. 131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

As soluções convencionais de tratamento biológico de corantes azo são baseadas em processos anaeróbio-aeróbios ocorrendo em unidades distintas. Este estudo avaliou o uso da aeração intermitente para a descoloração do Direct Black 22 (DB22) e biodegradação simultânea de subprodutos tóxicos no mesmo compartimento reacional. Os microrganismos utilizados foram obtidos de florestas tropicais e previamente adaptados a concentrações crescentes de DB22 (10-32,5 mg.L<sup>-1</sup>) em meio de cultivo. Os efeitos da concentração inicial de glicose (1 – 2 – 3 g.L<sup>-1</sup>) e aeração intermitente (0 – 4 – 8 h.d<sup>-1</sup>) sobre a descoloração, constante de descoloração e remoção de demanda química de oxigênio (DQO) foram investigados por planejamento fatorial e análise de superfície de resposta. Os testes foram conduzidos com água residuária (AR) que simulava a composição dos efluentes de lavanderias têxteis do agreste pernambucano. Os resultados demonstraram que a descoloração no longo prazo não foi inibida para ciclos de aeração de até 4 h.d<sup>-1</sup>, embora menores velocidades de remoção de cor tenham sido obtidas nestas condições. Os efeitos negativos da aeração foram significativamente reduzidos pelo aumento da concentração de glicose na AR. Ademais, a remoção de DQO foi potencializada com o aumento da frequência de aeração. Após descoloração do DB22 nos ensaios não aerados, verificou-se a formação de picos de absorvância relacionados à presença de aminas aromáticas ou outros intermediários da descoloração redutiva; o que não ocorreu nos experimentos aerados. Estes fatores resultaram em menor toxicidade à *Daphnia magna* em experimento modelo com nível intermediário de aeração. O sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina HiSeq revelou a presença de gêneros de bactérias conhecidos por produzirem enzimas envolvidas na biodegradação do azo. Observou-se, ainda, uma correlação positiva entre diversidade microbiana e eficiência de descoloração. Os resultados sugerem que a estratégia de aeração intermitente, corretamente implementada, pode melhorar a performance do tratamento biológico de efluentes têxteis que contém azo-corantes.

**Palavras-chave:** Direct Black 22. Efluente têxtil. Descoloração redutiva. Aminas aromáticas. Planejamento fatorial. Ecotoxicidade. Sequenciamento massivo do gene 16S rRNA. Diversidade microbiana. DGGE.



## ABSTRACT

Oliveira, J. M. S. **Intermittent aeration strategy for enhanced azo dye degradation by microbial consortium obtained from tropical forests**. 2019. 131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Conventional technologies for biological treatment of azo dyes are based on anaerobic-aerobic processes taking place into distinct units. This study evaluated the use of intermittent aeration strategy for decolorization of the Direct Black 22 (DB22) and simultaneous biodegradation of metabolites. Microorganisms were obtained from tropical forests and previously acclimated to increasing concentrations of DB22 (10-32.5 mg.L<sup>-1</sup>) in growth medium. Effects of initial glucose concentration (1 – 2 – 3 g.L<sup>-1</sup>) and intermittent aeration (0 – 4 – 8 cycles.d<sup>-1</sup>) on response variables decolorization, decolorization rate, and removal of chemical oxygen demand (COD) were investigated using factorial design and response surface analysis. Tests were conducted using a wastewater that simulated the composition of textile laundry effluents from a region with harsh climate in the state of Pernambuco, known as *agreste pernambucano*. Results showed long-term decolorization was not impaired for up to 4 cycles.d<sup>-1</sup> of aeration, although a decrease in color removal velocities was observed in these experiments. Negative impacts of aeration were significantly reduced by increasing initial glucose concentration. Moreover, COD removal was enhanced with increased aerations levels. After DB22 degradation in non-aerated batches, the formation of absorbance peaks associated with aromatic amines and other byproducts of reductive decolorization was observed; which did not occur in the aerated experiments. These resulted in lower toxicity to *Daphnia magna* in model experiment using intermediate level of aeration. 16S rRNA gene sequencing on the Illumina HiSeq platform revealed the presence of several bacteria known to produce enzymes involved in azo compounds degradation. Furthermore, a positive correlation between microbial diversity and decolorization efficiency was observed. Results suggest intermittent aeration strategy can enhance biological treatment of textile effluents containing azo dyes when correctly implemented.

**Keywords:** Direct Black 22. Textile effluent. Reductive decolorization. Aromatic amines. Factorial design. Ecotoxicity. 16S rRNA gene sequencing. Microbial diversity. DGGE.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> (A) Número de unidades locais e (B) pessoal ocupado por unidade de federação em empresas do setor têxtil e de confecção com cinco ou mais pessoas ocupadas. ....	33
<b>Figura 3.2.</b> Fluxograma típico de processos envolvidos no pré-tratamento do algodão, com detalhes sobre a geração de águas residuárias em cada etapa. ....	35
<b>Figura 3.3.</b> Classificação de corantes quanto ao método de aplicação e estrutura química. Em vermelho: classificação do Direct Black 22. ....	38
<b>Figura 3.4.</b> Estrutura química do corante azóico Direct Black 22, ácido naftaleno-2-sulfônico (A), anilina (B) e ácido sulfanílico (C). Verde: grupo cromóforo tipo azo. Vermelho: grupos auxocromes. Laranja: grupamento sulfonato.....	39
<b>Figura 3.5.</b> Mecanismo de descoloração reductiva de azo-corantes. (a) via direta enzimática; e (b) via indireta catalisada por mediador redox. DE = doador de elétrons; DE <sub>ox</sub> = doador de elétrons oxidado; B = bactéria; MR <sub>ox</sub> = mediador redox oxidado; MR <sub>red</sub> = mediador redox reduzido. ....	41
<b>Figura 4.1.</b> Diagrama com informações acerca de etapas do estudo e principais análises realizadas. ....	44
<b>Figura 4.2.</b> Representação espacial de pontos de coleta de material lignocelulósico e solo utilizados como fonte de microrganismos. Datum: WGS 1984. ....	46
<b>Figura 4.3.</b> Esquema de operação das bateladas. Experimentos inoculados com 10% (v/v) do consórcio microbiano pré-cultivado por 24 h e sujeitos à aeração intermitente controlada por temporizador digital.....	50
<b>Figura 4.4.</b> Estratégia de aeração intermitente utilizada nos ensaios. A aeração foi providenciada por meio de bomba aeradora modelo Big Air A320 a uma vazão de 2,5 L/min. Foi utilizada uma pedra porosa (12x25 mm) para facilitar a difusão do ar no meio líquido. Os ciclos de aeração possuíam duração de 1 h. ....	50
<b>Figura 4.5.</b> Semente germinada de <i>L. sativa</i> . ....	57
<b>Figura 5.1.</b> Verificação visual da descoloração da AR contendo DB22 ao longo do tempo em duplicatas de experimentos modelo, a saber: E-04: 2 g.L <sup>-1</sup> glicose, 0 h.d <sup>-1</sup> aeração intermitente; E-05: 2 g.L <sup>-1</sup> glicose, 4 h.d <sup>-1</sup> aeração intermitente.....	60

<b>Figura 5.2.</b> Efeitos da concentração de glicose na remoção de cor ao longo do tempo. Condições de aeração intermitente: A) 0 h.d <sup>-1</sup> ; B) 4 h.d <sup>-1</sup> ; e C) 8 h.d <sup>-1</sup> . .....	61
<b>Figura 5.3.</b> Efeitos da concentração inicial de glicose na evolução da demanda química de oxigênio (DQO) média ao longo do tempo. Condições de aeração intermitente: A) 0 h.d <sup>-1</sup> ; B) 4 h.d <sup>-1</sup> ; e C) 8 h.d <sup>-1</sup> . .....	62
<b>Figura 5.4.</b> Efeitos da aeração intermitente na remoção de cor média ao longo do tempo. Concentração inicial de glicose: A) 1 g.L <sup>-1</sup> ; B) 2 g.L <sup>-1</sup> ; e C) 3 g.L <sup>-1</sup> . .....	62
<b>Figura 5.5.</b> Aspecto visual de efluente tratado nas condições de 2 g.L <sup>-1</sup> glicose e ausência de ciclos de aeração. À esquerda, efluente ao final do tratamento; e, à direita, o mesmo efluente após centrifugação (5 min x 9000 rpm). .....	64
<b>Figura 5.6.</b> Efeitos da aeração intermitente na evolução da demanda química de oxigênio (DQO) média ao longo do tempo. Concentração inicial de glicose: A) 1 g.L <sup>-1</sup> ; B) 2 g.L <sup>-1</sup> ; e C) 3 g.L <sup>-1</sup> . .....	65
<b>Figura 5.7.</b> Diagrama de Pareto dos coeficientes de regressão para a variável descoloração (120 h). Nível de significância de 10%. .....	67
<b>Figura 5.8.</b> Superfície de resposta para a variável dependente descoloração (120 h) em função da concentração inicial de glicose e aeração intermitente. .....	69
<b>Figura 5.9.</b> Diagrama de Pareto dos coeficientes de regressão para a variável constante de descoloração. Nível de significância de 10%. .....	71
<b>Figura 5.10.</b> Superfície de resposta para a variável constante de descoloração em função da concentração inicial de glicose e aeração intermitente. .....	74
<b>Figura 5.11.</b> Diagrama de Pareto dos coeficientes de regressão para a variável constante de descoloração. Nível de significância de 10%. .....	75
<b>Figura 5.12.</b> Concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) nos reatores de batelada após 120 h de tratamento biológico.....	76
<b>Figura 5.13.</b> Superfície de resposta para a variável remoção de DQO como função da concentração inicial de glicose e aeração intermitente. .....	78
<b>Figura 5.14.</b> Espectro UV-VIS de efluente durante a descoloração do DB22 em ensaio modelo. E-07: 3 g.L <sup>-1</sup> glicose; 0 h.d <sup>-1</sup> aeração intermitente.....	79
<b>Figura 5.15.</b> Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-01 e E-02. E-01: 1 g.L <sup>-1</sup> glicose, 0 h.d <sup>-1</sup> aeração intermitente; E-02: 1 g.L <sup>-1</sup> glicose, 4 h.d <sup>-1</sup> aeração intermitente. ....	80

- Figura 5.16.** Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-04 e E-05. E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-05: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente..... 80
- Figura 5.17.** Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-07 e E-08. E-07: 3 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-08: 3 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente..... 81
- Figura 5.18.** Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-03 e E-09. E-03: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 8 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-09: 3 g.L<sup>-1</sup> glicose, 8 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente..... 82
- Figura 5.19.** Dendograma gerado por análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil de bandas do DGGE de fragmentos do rDNA 16S para o Domínio Bacteria. .... 84
- Figura 5.20.** Correlação entre remoção de cor e índices ecológicos em cada experimento (E-01 a E-09). Colunas indicam os valores dos respectivos índices e pontos indicam a eficiência de descoloração. A linha tracejada representa a diversidade ou dominância do inóculo..... 87
- Figura 5.21.** Representação da eficiência de remoção de cor e diversidade microbiana em experimentos modelos para fins de comparação. .... 87
- Figura 5.22.** Parâmetros considerados na escolha dos experimentos alvos do sequenciamento do gene 16S rRNA..... 89
- Figura 5.23.** Curvas de rarefação definidas para OTUs com 97% de similaridade das sequências das amostras de Inóculo, E-02 e E-04. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup>..... 91
- Figura 5.24.** Abundância relativa dos principais filos do domínio Bacteria presentes nas amostras do inóculo e de duas condições experimentais distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente..... 92
- Figura 5.25.** Abundância relativa dos principais gêneros do domínio Bacteria presentes nas amostras do inóculo e de duas condições experimentais distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente..... 94
- Figura 5.26.** Representação circular dos gêneros microbianos com maiores valores de abundância relativa no inóculo e em duas condições experimentais distintas. Ensaio 02: 1 g.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; Ensaio 04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.

..... 97

**Figura 5.27.** Proporção relativa de bactérias anaeróbias ou fermentativas, facultativas e aeróbias dentre os principais gêneros presentes nas amostras de inóculo e de duas condições experimentais distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup>. .... 99

**Figura 5.28.** Taxa de germinação (GR) de sementes de *L. sativa* incubadas com as frações inorgânicas da AR sintética com concentração variável de NaHCO<sub>3</sub> (1 – 2 – 3 g.L<sup>-1</sup>). Demais componentes: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,25 g.L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,50 g.L<sup>-1</sup>) e NaCl (0,50 g.L<sup>-1</sup>). Ensaios realizados em sextuplicata, com 5 sementes por réplica. .... 100

**Figura 5.29.** Taxa de germinação (GR) de sementes de *L. sativa* incubadas com efluente têxtil sintético contendo DB22 (32,5 mg.L<sup>-1</sup>) após tratamento biológico em diferentes condições experimentais. S/T: efluente sem tratamento. Concentrações de glicose testadas: A) 1 g.L<sup>-1</sup>; B) 2 g.L<sup>-1</sup>; e C) 3 g.L<sup>-1</sup>. Ensaios realizados em sextuplicata, com 5 sementes por réplica. .... 101

**Figura 5.30.** Taxa de germinação (GR) de sementes de *L. sativa* incubadas com efluente têxtil sintético contendo DB22 (32,5 mg.L<sup>-1</sup>) após tratamento biológico em duas condições experimentais distintas. S/T: sem tratamento; E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente. Ensaios realizados em sextuplicata, com 10 sementes por réplica. .... 102

**Figura 5.31.** Sobrevivência média de neonatos de *D. magna* expostos durante 48 h a diferentes diluições de amostras de efluente têxtil sintético contendo DB22 (32,5 mg.L<sup>-1</sup>) após tratamento biológico por 120 h em duas condições distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente. .... 104

**Figura 5.32.** Disposição de Béqueres (100 mL) em ensaios agudos de ecotoxicidade utilizando *D. magna* como bioindicador. À esquerda, experimento E-02 (1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente) e, à direita, experimento E-04 (2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente).. 105

**Figura A.1.** Imagens de microscópio ótico de contraste de fase de consórcio bacteriano preservado em glicerina 50% (v.v<sup>-1</sup>) após reativação em MC por período de 24 h. As fotomicrografias revelam a predominância de bactérias dos tipos bacilo (A), cocobacilo (B) e cocos (C). .... 122

<b>Figura B.1.</b> Carta-controle da sensibilidade de <i>D. magna</i> para a substância de referência $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .	123
<b>Figura C.1.</b> Gráfico de valores preditos versus observados para a resposta descoloração ( $Y_1$ ) após 120 h de experimento.	124
<b>Figura C.2.</b> Gráfico dos resíduos deixados pelo ajuste de um modelo quadrático às respostas de descoloração ( $Y_1$ ) obtidas após 120 h de experimento	125
<b>Figura C.3.</b> Gráfico de valores preditos versus observados para a resposta K ( $Y_2$ )	126
<b>Figura C.4.</b> Gráfico dos resíduos deixados pelo ajuste de um modelo quadrático às respostas de K ( $Y_2$ )	127
<b>Figura C.5.</b> Gráfico de valores preditos versus observados para a resposta remoção de DQO ( $Y_3$ ) após 120 h de experimento.	128
<b>Figura C.6.</b> Gráfico dos resíduos deixados pelo ajuste de um modelo quadrático às respostas de remoção de DQO ( $Y_3$ ) após 120 h de experimento.	129
<b>Figura D.1.</b> Efeitos da concentração de glicose na evolução do pH médio ao longo do tempo. Condições de aeração intermitente: a) $0 \text{ h.d}^{-1}$ ; b) $4 \text{ h.d}^{-1}$ ; e c) $8 \text{ h.d}^{-1}$	130
<b>Figura D.2.</b> Efeitos da aeração intermitente na evolução do pH médio ao longo do tempo. Concentração inicial de glicose: a) $1 \text{ g.L}^{-1}$ ; b) $2 \text{ g.L}^{-1}$ ; e c) $3 \text{ g.L}^{-1}$	131



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 5.1.</b> Resultados do planejamento fatorial $3^2$ para investigar os efeitos da concentração de glicose ( $X_1$ ) e aeração intermitente ( $X_2$ ) na descoloração ( $Y_1$ ), constante de descoloração ( $Y_2$ ) e remoção de DQO ( $Y_3$ ) de efluente simulado contendo Direct Black 22. Médias de experimentos realizados em duplicata. ....	59
<b>Tabela 5.2.</b> Parâmetros do ajuste de um modelo de primeira ordem aos dados de descoloração do DB22 ao longo do tempo. ....	63
<b>Tabela 5.3.</b> ANOVA dos coeficientes de regressão para a resposta descoloração ( $Y_1$ ) após 120 h de experimento. Nível de significância de 10%. ....	66
<b>Tabela 5.4.</b> ANOVA para o ajuste de um modelo quadrático às respostas de descoloração ( $Y_1$ ) obtidas após 120 h de experimento. Nível de significância de 10%. ....	68
<b>Tabela 5.5.</b> Respostas previstas e observadas para a variável dependente descoloração final (120 h) obtidas em cada condição do experimento fatorial. ....	69
<b>Tabela 5.6.</b> ANOVA dos coeficientes de regressão para a resposta constante de descoloração ( $Y_2$ ). Nível de significância de 10%. ....	70
<b>Tabela 5.7.</b> ANOVA para o ajuste de um modelo quadrático às respostas de constante de descoloração ( $Y_2$ ). Nível de significância de 10%. ....	72
<b>Tabela 5.8.</b> Respostas previstas e observadas para a variável dependente constante de descoloração obtidas em cada condição do experimento fatorial. ....	73
<b>Tabela 5.9.</b> ANOVA dos coeficientes de regressão para a resposta remoção de DQO ( $Y_3$ ). Nível de significância de 10%. ....	75
<b>Tabela 5.10.</b> ANOVA para o ajuste de um modelo quadrático às respostas de remoção de DQO ( $Y_3$ ). Nível de significância de 10%. ....	77
<b>Tabela 5.11.</b> Respostas previstas e observadas para a variável dependente constante de descoloração obtidas em cada condição do experimento fatorial. ....	77
<b>Tabela 5.12.</b> Índices ecológicos de Shannon ( $H'$ ) e Dominância (D) em amostras de biomassa coletadas ao fim de cada experimento fatorial e eficiência média de remoção de cor dos respectivos ensaios. ....	86
<b>Tabela 5.13.</b> Índices ecológicos de Shannon ( $H'$ ), Dominância (D) e Chao-1 (S1) e outros parâmetros do sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras de biomassa coletadas no início (Inóculo) e ao fim dos ensaios E-02 e E-04. E-02: 1 g.L <sup>-1</sup> glicose, 4 h.d <sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L <sup>-1</sup> glicose, 0 h.d <sup>-1</sup> . ....	90

**Tabela 5.14.** Taxa de germinação (GR) média, comprimento total da radícula (RLS) e índice de germinação (GI) das amostras de duas condições distintas, antes e após tratamento biológico por 120 h. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente. Ensaios realizados em sextuplicata, com 10 sementes por réplica..... 102

**Tabela 5.15.** Sobrevivência média de neonatos de *D. magna* expostos durante 48 h a diferentes diluições de amostras de efluente têxtil sintético contendo DB22 (32,5 mg.L<sup>-1</sup>), antes e após tratamento biológico por 120 h em duas condições distintas; e valor estimado da CE<sub>50</sub>/DIL. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente. .... 104



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	27
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS .....	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
3.1. O Setor têxtil e de confecção no Brasil .....	33
3.2. Processo fabril e geração de efluentes na indústria têxtil e de confecção .....	34
3.3. Legislação brasileira e abrangência dos corantes de origem antrópica .....	36
3.4. Corantes e pigmentos orgânicos.....	37
3.5. Corantes azo e subprodutos da degradação biológica .....	39
3.6. Tratamento biológico de efluentes da indústria têxtil .....	40
3.6.1. Descoloração reductiva de corantes azo.....	40
3.6.2. Degradação de corantes azo por microrganismos produtores de enzimas modificadoras da lignina <sup>41</sup>	
3.7. Utilização de consórcios microbianos no tratamento de corantes azo .....	42
3.8. Aeração intermitente aplicada à biodegradação de aminas aromáticas.....	42
3.9. Considerações parciais .....	43
4. MATERIAL E MÉTODO.....	44
4.1. Efluente têxtil sintético.....	45
4.1.1. Corante e processo de hidrólise.....	45
4.1.2. Constituintes da água residuária.....	45
4.2. Fonte de microrganismos .....	45
4.3. Obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano .....	47
4.4. Preparo de inóculo.....	47
4.5. Planejamento experimental aplicado à degradação do DB22 e de subprodutos .....	48
4.5.1. Planejamento fatorial completo.....	48
4.5.2. Modelo empírico e superfície de resposta.....	49
4.6. Operação das bateladas .....	50
4.7. Análises físico-químicas .....	51
4.7.1. Cor, pH, DQO, SSV e Alcalinidade .....	51
4.7.2. Biodegradação do DB22 e produção de aminas aromáticas .....	51
4.7.3. Cinética de degradação.....	51
4.8. Análises microbiológicas .....	53
4.8.1. Morfologia dos microrganismos .....	53
4.8.2. Amostragem, extração e integridade do DNA genômico.....	53
4.8.3. Sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA.....	53

4.8.4.	Reação em cadeia da polimerase, eletroforese em gel de gradiente desnaturante e análise multivariada do perfil de bandas .....	54
4.8.5.	Cálculo de índices ecológicos .....	55
4.9.	Ensaio ecotoxicológico.....	56
4.9.1.	Testes com semente de <i>Lactuca sativa</i> .....	56
4.9.2.	Testes com <i>Daphnia magna</i> .....	58
4.9.3.	Análise estatística .....	58
5.	RESULTADOS .....	59
5.1.	Planejamento fatorial completo.....	59
5.1.1.	Efeitos da concentração de glicose.....	60
5.1.2.	Efeitos da aeração intermitente.....	62
5.2.	Modelo empírico e superfície de resposta .....	66
5.2.1.	Descoloração .....	66
5.2.2.	Constante de descoloração.....	70
5.2.3.	Remoção de DQO.....	74
5.3.	Biodegradação do DB22 e produção de metabólitos.....	79
5.4.	Considerações sobre a comunidade microbiana degradadora de azo .....	83
5.5.	Análise da diversidade por DGGE .....	84
5.5.1.	Análise multivariada do perfil de bandas .....	84
5.5.2.	Índices ecológicos .....	86
5.6.	Sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA.....	89
5.6.1.	Índices ecológicos .....	90
5.6.2.	Caracterização filogenética.....	92
5.6.3.	Classificação das bactérias com base no metabolismo celular .....	99
5.7.	Ecotoxicidade .....	100
5.7.1.	Ensaio de toxicidade com semente de <i>Lactuca sativa</i> .....	100
5.7.2.	Ensaio de toxicidade com <i>Daphnia magna</i> .....	104
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE AS HIPÓTESES DE ESTUDO .....	107
7.	CONCLUSÕES .....	111
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112
	APÊNDICE A.....	122
	APÊNDICE B .....	123
	APÊNDICE C .....	124
	APÊNDICE D.....	130

## 1. INTRODUÇÃO

O setor têxtil e de confecção tem grande relevância econômica e social no Brasil. De acordo com o relatório *Pesquisa Industrial Anual – Empresa* do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), as atividades de fabricação de produtos têxteis e de confecção, juntas, foram responsáveis por uma receita bruta de 113,9 bilhões de reais em 2015. Os maiores polos de produção se localizam nos estados de São Paulo e Santa Catarina, além do recente crescimento do setor na região nordeste, especialmente em cidades do agreste pernambucano.

A produção de artigos têxteis e de vestuário, no entanto, pode ameaçar o equilíbrio dos ecossistemas ambientais se correta atenção não for dada aos poluentes gerados durante o processo fabril. Em uma indústria de processamento de algodão, as etapas de preparação das fibras, fios ou tecidos para o tingimento gera um efluente com elevadas concentrações de compostos químicos orgânicos e inorgânicos (Harane e Adivarekar, 2016). Ademais, após o tingimento, os compostos não fixados à fibra são lavados, produzindo uma água residuária (AR) com elevada cor e salinidade (Dos Santos et al., 2007; EPA, 1997). A legislação brasileira não estabelece limites para o lançamento de corantes de origem antrópica, apenas ressaltando que estes não devem alterar as classes dos corpos hídricos, ficando a decisão à critério do órgão ambiental (CONAMA, 2011, 2005). Poucas indústrias se preocupam com o efeito poluente de suas ARs devido à permissividade da lei.

Dentre os corantes, os da classe azo são os mais utilizados no mundo (Amorim et al., 2013; Kunz et al., 2002). Estes compostos possuem grande importância ambiental, já que são de difícil tratabilidade em estações de tratamento de esgoto convencionais, são tóxicos e sua degradação incompleta pode dar origem a aminas aromáticas carcinogênicas (Pinheiro et al., 2004; Singh et al., 2015).

O tratamento biológico em condições anaeróbias tem sido bastante mencionado na literatura científica. No processo denominado *descoloração redutiva*, o azo é reduzido diretamente pela ação de enzimas biológicas, ou indiretamente, na presença de mediadores de óxido-redução (mediador redox, MR) (Singh et al., 2015). Apesar disso, a degradação desses corantes é incompleta nessas condições, tornando necessária a utilização de um pós-tratamento aeróbio para a remoção dos intermediários tóxicos (Amaral et al., 2014; Amorim et al., 2013; Braúna et al., 2009; Gavazza et al., 2015; Imran et al., 2016; Sharma et al., 2016; Talarposhti et al., 2001).

Neste estudo, optou-se pelo uso da aeração intermitente como alternativa aos processos convencionais anaeróbio-aeróbios. Nesta nova abordagem, a redução do azo deve ocorrer nas fases anóxicas, enquanto a biodegradação de metabólitos e de matéria orgânica é potencializada nos estágios aerados. Elimina-se, assim, a necessidade de unidades separadas para cada processo e economiza-se com custos de aeração.

A escolha de solos e resíduos lignocelulósicos como fonte do consórcio microbiano é outro diferencial do trabalho. Os microrganismos que colonizam estes substratos são conhecidos por produzirem uma grande variedade de enzimas óxido-redutases não-específicas, que estão associadas à decomposição da matéria orgânica complexa. É sabível que estas enzimas podem mediar a biodegradação de compostos da classe azo (Adnan et al., 2015; Khlifi et al., 2010; Senan e Abraham, 2004).

Para entender como alguns parâmetros-chave afetam a biodegradação do azo em processos com utilização de aeração intermitente, avaliou-se a influência da concentração de co-substrato e nível de aeração intermitente na biodegradação do Direct Black 22 (DB22) em reatores de batelada. Em uma lavanderia têxtil de porte médio situada na região nordeste do Brasil, Amaral et al. (2014) relataram um consumo de 779 kg de DB22 em um período de 335 dias, sendo o mais utilizado.

O inóculo foi previamente adaptado a concentrações crescentes de DB22 (10-32,5 mg.L<sup>-1</sup>) em meio de cultivo. Os efeitos da concentração inicial de glicose (1 – 2 – 3 g.L<sup>-1</sup>) e aeração intermitente (0 – 4 – 8 h.d<sup>-1</sup>) sobre as variáveis respostas descoloração, constante de descoloração (K) e remoção de demanda química de oxigênio (DQO) foram investigados por planejamento fatorial e análise de superfície de resposta. A AR utilizada simulava as características dos efluentes de lavanderias têxteis localizadas no agreste Pernambucano, com base em estudos desenvolvidos por Amaral et al. (2017, 2014), Amorim et al. (2013) e Ferraz et al. (2011).

O grau de mineralização do DB22 foi qualitativamente avaliado nos experimentos fatoriais por espectrofotometria UV-VIS. Ademais, foram conduzidos ensaios ecotoxicológicos agudos utilizando sementes de *Lactuca sativa* e neonatos de *Daphnia magna* como bioindicadores. Estes resultados forneceram informações importantes a respeito da influência dos fatores investigados sobre a formação e biodegradação de compostos intermediários tóxicos.

Por fim, a caracterização filogenética da biomassa microbiana envolvida e análise da diversidade por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *denaturing gradient gel electrophoresis*) auxiliaram no entendimento de como estes fatores afetam as proporções entre as populações e a diversidade de microrganismos, observando-se os reflexos sobre as eficiências de remoção de cor e de matéria orgânica e ecotoxicidade da AR tratada biologicamente.



## 2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

**Hipótese A:** Os microrganismos obtidos de material lignocelulósico e solo, quando adaptados, são capazes de degradar o Direct Black 22 (DB22).

**Objetivo:** adaptar e caracterizar um consórcio de microrganismos obtido de regiões florestais, observando a sua capacidade de descolorir o DB22.

**Hipótese B:** A aeração intermitente e concentração inicial de co-substrato exercem pressões seletivas na comunidade de microrganismos.

**Objetivo:** utilizar-se de ferramentas de biologia molecular para avaliar como a composição da comunidade microbiana do inóculo se altera em condições modelos do planejamento fatorial.

**Hipótese C:** Consórcios microbianos mais diversos são mais eficientes em degradar o DB22 da AR.

**Objetivo:** avaliar a diversidade de populações microbianas nos experimentos por DGGE, observando-se a correlação entre os índices ecológicos e a remoção de cor da AR.

**Hipótese D:** A concentração inicial de co-substrato e aeração intermitente são fatores que influenciam a remoção de cor e de matéria orgânica da AR têxtil simulada contendo o DB22.

**Objetivo:** avaliar os efeitos da concentração inicial de glicose e do tempo de aeração intermitente, bem como a interação desses efeitos, sobre as variáveis quantitativas descoloração, constante de descoloração e remoção de DQO com o uso de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta.

**Hipótese E:** O consórcio microbiano é capaz de degradar o corante azo inclusive na presença de oxigênio.

**Objetivo:** avaliar os efeitos da aeração intermitente sobre a descoloração do DB22, observando-se possíveis variações na cor do efluente durante as fases aeradas dos experimentos.

**Hipótese F:** A concentração inicial de co-substrato e aeração intermitente são fatores que influenciam o grau de mineralização do DB22.

**Objetivo:** avaliar o grau de mineralização do DB22 nos experimentos fatoriais, observando-se as alterações no perfil espectral UV-VIS da AR com o decorrer do tempo.

**Hipótese G:** A aplicação de aeração intermitente permite maior remoção de ecotoxicidade da AR.

**Objetivo:** avaliar a remoção de ecotoxicidade da AR nos experimentos fatoriais, utilizando sementes de *Lactuca sativa* e neonatos de *Daphnia magna* como bioindicadores.



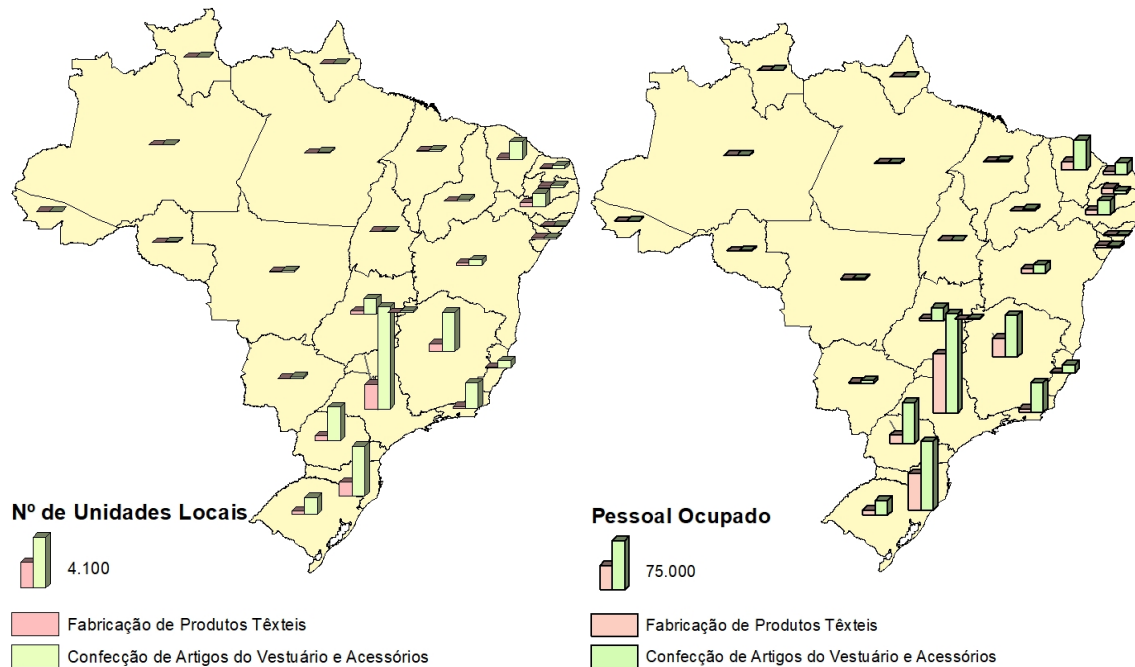
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O Setor têxtil e de confecção no Brasil

A indústria da transformação empregava aproximadamente 7,4 milhões de trabalhadores assalariados no final de 2015, possuindo um total de 179,2 mil empresas ativas no mesmo ano. O setor têxtil e de confecção, em especial, foi responsável por empregar 11,2% deste pessoal e por gerar uma receita bruta de 113,9 bilhões de reais (IBGE, 2015). Assim, o segmento assume grande relevância socioeconômica.

O estado de São Paulo é o maior produtor têxtil do Brasil, possuindo 10,2 mil unidades locais e empregando aproximadamente 238 mil trabalhadores em 2015 (**Figura 3.1**). Estados como Santa Catarina, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Ceará e Pernambuco vêm na sequência, com um número de unidades fabris variando de 1469 a 5154. Das principais macrozonas de produção, a região Nordeste se destaca por ter experimentado um crescimento exponencial nos últimos anos, resultado dos diversos incentivos fiscais concedidos pelo governo de alguns estados e mão de obra local barata. O polo têxtil do agreste pernambucano – compreendido pelos municípios de Caruaru, Santa Cruz do Capibaribe e Toritama – foi o principal responsável pela alavancagem do setor na região (Frota et al., 2014).

**Figura 3.1.** (A) Número de unidades locais e (B) pessoal ocupado por unidade de federação em empresas do setor têxtil e de confecção com cinco ou mais pessoas ocupadas.



Dados: IBGE, 2015. Fonte: elaboração própria.

O governo de São Paulo, em 2017, assinou um decreto que isenta as indústrias do setor têxtil do pagamento do Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços em resposta aos benefícios concedidos por outros estados brasileiros, incluindo o Rio de Janeiro e Minas Gerais. A medida teria como objetivo evitar a evasão de novas empresas do setor para outras unidades federativas (ISTOÉ, 2017).

### 3.2. Processo fabril e geração de efluentes na indústria têxtil e de confecção

O setor têxtil e de confecção movimentam a economia regional e gera empregos. Entretanto, o processo de fabricação de produtos do gênero gera resíduos em muitas de suas etapas. A Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA) tem como princípios, dentre outros, a proteção dos ecossistemas e o controle de atividades potencial ou efetivamente poluidoras (Brasil, 1981). Neste sentido, os poluentes gerados pela indústria têxtil devem ser corretamente tratados e dispostos, respeitando-se os objetivos da PNMA.

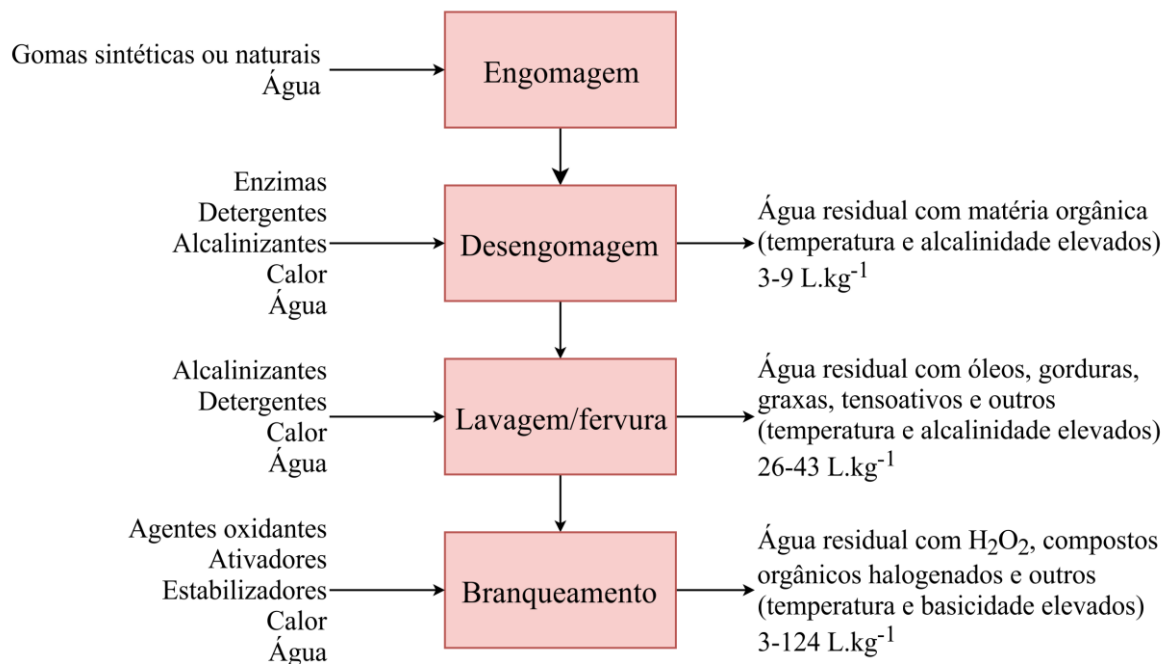
Para que o tecido adquira as propriedades desejadas pelo consumidor, é necessário que este passe por uma série de processos com o objetivo de torná-lo mais resistente, durável e estético. Estes processos são conhecidos como *tratamento a úmido* (do inglês, *wet processing*) e são subdivididos em: preparação, tingimento e acabamento. O tratamento a úmido é caracterizado por compreender banhos químicos e repetidos procedimentos de lavagem e enxague, sendo responsável pela maior geração das ARs do processo fabril têxtil (EPA, 1997). O processo pode variar caso a matéria-prima processada seja diferente do algodão, como a lã ou fibras sintéticas, ou a depender das características desejadas para o produto final (EPA, 1997; INETI, 2000).

A preparação compreende as etapas de: i) engomagem e desengomagem, com o objetivo de conferir proteção e resistência às fibras; ii) lavagem, onde são removidos os óleos, gorduras e graxas, aumentando a hidrofília do material; iii) branqueamento, processo onde são utilizados agentes oxidantes para embranquecer o tecido; e iv) mercerização, etapa opcional onde as fibras se tornam mais resistentes, lustrosas e com maior afinidade ao corante (Dos Santos et al., 2007; EPA, 1997; Harane and Adivarekar, 2016). Detalhes sobre o pré-tratamento de fibras, fios ou tecidos de algodão são demonstrados na **Figura 3.2**.

Durante a engomagem, são adicionados compostos naturais ou sintéticos, a saber: amido, goma, cola, álcool polivinílico, carboximetil celulose, entre outros. Na desengomagem, estes químicos são removidos, processo onde é gerado um efluente com elevadas concentrações de sólidos totais e de DQO. As impurezas da fibra são posteriormente removidas com adição

de álcali no processo de lavagem, com adicional geração de efluente. Na etapa subsequente, o branqueamento, são adicionados oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, para a remoção de cor indesejada (Dos Santos et al., 2007).

**Figura 3.2.** Fluxograma típico de processos envolvidos no pré-tratamento do algodão, com detalhes sobre a geração de águas residuárias em cada etapa.



Adaptado de Santos; Cervantes; Van Lier (2007); EPA (1997); Harane; Adivarekar (2016); INETI, (2000).

O tingimento pode ser realizado em modo contínuo ou em batelada, podendo ser empregado nas mais diversas etapas do processamento da matéria-prima (e.g., fibras, fios e peças). Neste processo, são utilizados químicos e/ou calor para fixar as moléculas do corante no tecido. Os químicos não aderidos são removidos durante a lavagem, gerando um efluente com elevada cor e concentração de sais muito variável (Dos Santos et al., 2007; EPA, 1997). Após o tingimento, os tecidos passam por uma etapa de acabamento, onde são utilizados tratamentos mecânicos ou químicos para conferir características específicas à fibra, e.g. maciez e brilho (EPA, 1997).

No Brasil, efluentes de lavanderias têxteis do agreste Pernambucano foram caracterizados por possuírem pH na faixa de 6,0-8,5, DQO elevada ( $>700 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e salinidade bastante variável (2,6-4,4 ‰) (Amaral et al., 2017, 2014; Amorim et al., 2013; Ferraz et al., 2011). Os íons de cloreto, sódio e sulfato estão normalmente presentes, resultados da adição de

sais (e.g. NaCl ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para melhorar a fixação do corante à fibra<sup>1</sup> (EPA, 1997). Ademais, o consumo de grandes quantidades de metabissulfito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)<sup>2</sup> – utilizado como oxidante na descoloração de peças do vestuário – foi relatado em lavanderias têxteis localizadas no agreste de Pernambuco, gerando um efluente com elevadas concentrações de sulfato (Amaral et al., 2017, 2014).

### 3.3. Legislação brasileira e abrangência dos corantes de origem antrópica

A Resolução N° 430/2011 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, não contempla os padrões para lançamento de ARs com concentrações elevadas de corantes, embora o lançamento destes efluentes não deva alterar a classe dos corpos hídricos receptores. A Resolução N° 357/2005 do CONAMA estabelece padrões de cor verdadeira que variam de acordo com as classes dos corpos hídricos, sendo que os corantes de origem antrópica devem estar virtualmente ausentes nos rios de Classe 1; e a presença destes compostos é tolerada em rios de Classes 2 e 3 desde que removíveis com processos de coagulação, sedimentação e filtração.

**Quadro 3.1.** Padrões de cor verdadeira e de corantes de fontes antrópicas para enquadramento de corpos de água.

Classe do corpo hídrico	Corantes de origem antrópica	Cor (mg.L <sup>-1</sup> Pt-Co)
Classe 1	Virtualmente ausentes	Nível natural de corpos de água
Classe 2	Removíveis por processos de coagulação, sedimentação e filtração	75
Classe 3	Removíveis por processos de coagulação, sedimentação e filtração	75
Classe 4	Não contemplado	Não contemplado

Dados: Resoluções CONAMA n. 357/2005 e 430/2011. Fonte: elaboração própria

As ARs da indústria têxtil são compostas por uma mistura de um ou mais corantes e de outras substâncias que conferem cor ao efluente, possuindo matizes semelhantes entre si e com propriedades que diferem daquelas dos padrões de platina-cobalto utilizados em ensaios convencionais de determinação de cor. Deste modo, outros métodos, como os métodos do

<sup>1</sup> Os sais são adicionados para proporcionar a exaustão dos sítios de ligação em corantes aniônicos, e.g. corantes reativos e diretos. Estima-se que a massa de sais utilizada nos banhos de tingimento pode chegar a até 80% da massa das peças. Dados: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1995).

<sup>2</sup> Amaral et al (2017) relatam um consumo de até 8925 kg de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, em uma lavanderia têxtil de porte médio, durante um período de acompanhamento de 22 meses.

*American Dye Manufactures Institute* (ADMI) e o método do registro do espectro, têm sido utilizados por oferecerem medidas mais precisas da cor do efluente. (APHA/AWWA/WEF, 2005; Wu et al., 1998).

A legislação brasileira menciona que os corantes de origem antrópica não devem estar presentes em corpos hídricos de classe 1 e, ainda, que os corpos receptores classes 2 e 3 podem apenas receber corantes removíveis por processos convencionais de tratamento de água. Entretanto, a normativa é vaga no sentido de que não há menção sobre quais os tipos de corantes removíveis nestes processos e em quais concentrações estes compostos são tolerados. Ademais, observa-se que a legislação não se preocupa com a ação tóxica dos corantes sobre os ecossistemas aquáticos, restringindo-se a mencionar os aspectos concernentes à potabilidade, i.e. as estações de tratamento de água convencionais devem ser capazes de removê-los.

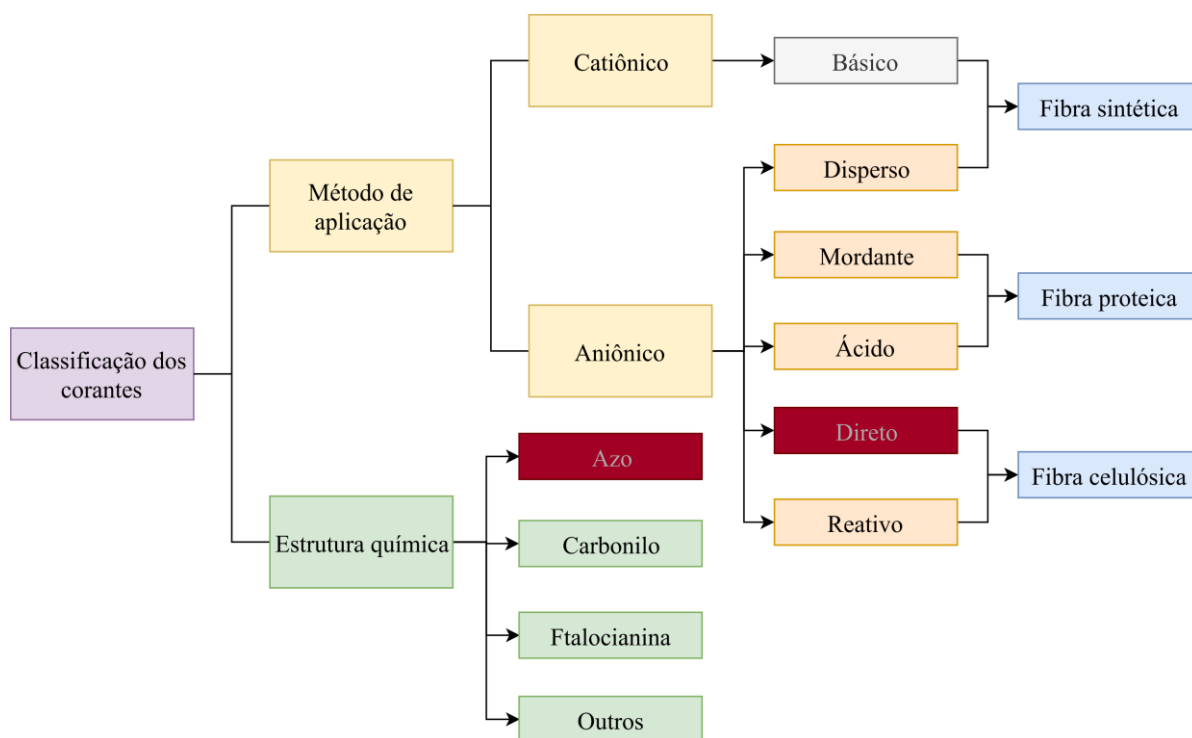
Além disto, os padrões de cor para enquadramento de corpos receptores nas classes 2 e 3 – mencionados na Resolução N°357/2005 do CONAMA – não são adequados para medir a presença de corantes na água, uma vez que estes se baseiam no método convencional de determinação espectrofotométrica de cor com utilização da escala platina-cobalto. A Resolução N° 430 do CONAMA, por sua vez, não oferece contribuições acerca do despejo de efluente com concentrações elevadas de cor.

### **3.4. Corantes e pigmentos orgânicos**

Corantes e pigmentos são compostos responsáveis por conferir cor a um determinado material. Os corantes se distinguem dos pigmentos por serem essencialmente solúveis em água, embora suas estruturas químicas sejam semelhantes. Ademais, os corantes são predominantemente utilizados no tingimento de materiais têxteis, enquanto os pigmentos são tradicionalmente empregados em outros materiais e.g. pinturas, plásticos, materiais de construção, cerâmicas e vidros (Christie, 2015). Neste estudo, os corantes serão abordados com maior detalhe em função dos objetivos do trabalho.

Os corantes podem ser classificados quanto ao seu método de aplicação ou de acordo com sua estrutura química (**Figura 3.3**). O primeiro método se baseia em um conjunto de propriedades que torna o composto apropriado para um material específico, i.e. afinidade a um tipo particular de fibra. As principais classes de aplicação para corantes são: ácidos, básicos, mordantes, diretos, reativos e dispersos (Christie, 2015).

**Figura 3.3.** Classificação de corantes quanto ao método de aplicação e estrutura química. Em vermelho: classificação do Direct Black 22.



Dados: Christie, 2015. Fonte: elaboração própria.

Do ponto de vista do tratamento biológico de ARs com corantes, porém, a classificação do *colorante*<sup>3</sup> quanto à sua estrutura química tem maior relevância. Isto ocorre porque os processos biológicos de tratamento de efluentes são pensados em função do metabolismo celular dos microrganismos envolvidos, o que inclui a capacidade de produzir as enzimas necessárias para a clivagem do composto alvo. Mais especificamente, a biodegradação dependerá da presença, na molécula do corante, de ligações que poderão ser atacadas por grupos funcionais do sítio ativo da enzima presente ou, ainda, da existência de grupos funcionais capazes de se ligar a esses sítios ativos, possibilitando com que a reação ocorra (Lima et al., 2001). Dentro desta classificação, os principais tipos de corantes são: azo (-N=N-), carbonilo (C=O), ftalocianina, metino (-CH=) e nitro (NO<sub>2</sub>) (Christie, 2015).

Os grupos mencionados acima são denominados  *cromóforos*  e são os principais responsáveis pela origem da cor nas moléculas de corante. Os  *colorantes*  podem conter, ainda, grupos auxocromes, que são responsáveis por melhorar a intensidade da cor, e.g. hidroxila (OH) e amina (NR<sub>2</sub>), e grupos sulfonatos (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que aumentam o grau de solubilidade em água (Christie, 2015).

<sup>3</sup> Tradução livre do inglês *colorant*. Refere-se a substâncias que conferem cor (corantes e pigmentos).

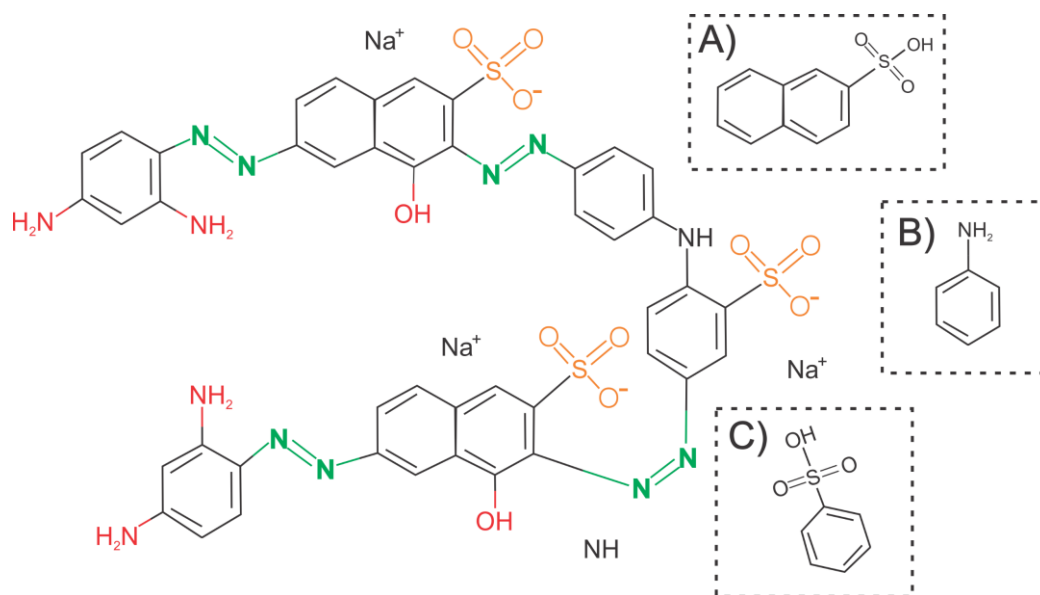
### 3.5. Corantes azo e subprodutos da degradação biológica

Os corantes que possuem o cromóforo tipo azo, i.e. que apresentam um ou mais grupos  $-N=N-$ , são classificados como corantes azóicos e são particularmente relevantes por serem amplamente utilizados pela indústria têxtil (Kunz et al., 2002). Esta classe de corantes tem grande importância ambiental devido a sua difícil tratabilidade em estações de tratamento de ARs convencionais e alta toxicidade (Forgacs et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Shaul et al., 1991; Singh et al., 2015).

A importância ambiental destes corantes se estende ao seu processo de tratamento, já que, muitas das vezes, sua degradação biológica resulta na formação de aminas aromáticas carcinogênicas que são recalcitrantes ao tratamento anaeróbio (Pandey et al., 2007). Neste sentido, alguns autores têm estudado processos biológicos de degradação do azo onde os metabólitos gerados são pouco tóxicos ou totalmente mineralizados (Sen et al., 2016; Tan et al., 2013).

O DB22 – objeto deste estudo – é um corante tetra-azo com presença de grupos sulfonatos (**Figura 3.4**). Com base na análise de sua estrutura química, presume-se que a degradação incompleta do DB22 pode originar compostos como a anilina, ácido naftaleno-2-sulfônico e ácido sulfanílico (Gavazza et al., 2015).

**Figura 3.4.** Estrutura química do corante azóico Direct Black 22, ácido naftaleno-2-sulfônico (A), anilina (B) e ácido sulfanílico (C). Verde: grupo cromóforo tipo azo. Vermelho: grupos auxocromes. Laranja: grupamento sulfonato.



Fonte: elaboração própria.

### 3.6. Tratamento biológico de efluentes da indústria têxtil

O tratamento físico-químico de ARs do setor têxtil tem sido empregado por muitas indústrias. Entretanto, os processos que envolvem coagulação química produzem uma grande quantidade de lodo contaminado, que precisa ser posteriormente disposto (Gavazza et al., 2015; Singh et al., 2015; Solanki et al., 2013). Ademais, algumas tecnologias envolvidas no tratamento físico-químico destes efluentes, e.g. membranas e meios filtrantes, possuem alto custo (Dos Santos et al., 2007; Sharma et al., 2016). A degradação biológica de azo-corantes tem sido estudada por vários autores pela premissa de oferecer uma solução mais sustentável do ponto de vista econômico e de produção de resíduos, além do seu potencial de reduzir ou até mesmo eliminar a toxicidade desses efluentes.

Existem duas linhas de pesquisa principais na área de tratamento biológico desses corantes, a saber: tratamento anaeróbico, em que a degradação do composto azo ocorre pelo mecanismo denominado *descoloração redutiva*; e tratamento com utilização de bactérias e fungos produtores de enzimas modificadoras da lignina (EMLs).

#### 3.6.1. Descoloração redutiva de corantes azo

No processo de descoloração redutiva, o azo-corante é reduzido diretamente pela ação de enzimas biológicas, ou indiretamente, na presença de mediadores de óxido-redução (mediador redox, MR). A descoloração redutiva só ocorre em anaerobiose em que o corante azo é o aceptor preferencial de elétrons. Em ambiente aeróbico, o oxigênio é o aceptor final de elétrons (Santos, 2001; Singh et al., 2015; Van Der Zee et al., 2003).

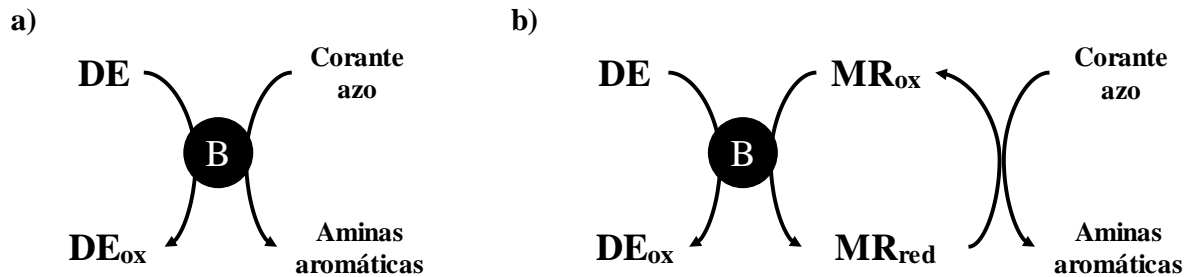
A **Figura 3.5** ilustra o mecanismo de redução de um composto azo por um equivalente redutor. Os equivalentes redutores são gerados na metabolização do co-substrato, que age como doador de elétrons, ou pelos subprodutos da degradação do próprio corante, sendo estes utilizados para que enzimas microbianas catalisem a reação de quebra da ligação azo (Imran et al., 2016). A principal enzima envolvida no processo é a azoredutase, mas algumas óxido-redutases não-específicas podem exercer papel relevante na descoloração redutiva (Jadhav et al., 2010; Pandey et al., 2007; Phugare et al., 2011; Telke et al., 2010).

Muitos autores reportaram, ainda, a importância dos MRs como catalisadores da redução enzimática (Dos Santos et al., 2007, 2004, 2003). Estes compostos atuam como carreadores de elétrons na condução dos equivalentes redutores produzidos no interior das células até a molécula de azo (Imran et al., 2016; Rau e Stolz, 2003). Apesar dos bons resultados



em experimentos de batelada, os efeitos do uso de MRs sobre a descoloração foram pouco expressivos em alguns estudos envolvendo sistemas de fluxo contínuo (Braúna et al., 2009; Dos Santos et al., 2003). Dos Santos et al. (2005), porém, obtiveram bons desempenhos pela combinação do uso de MRs e temperatura termofílica.

**Figura 3.5.** Mecanismo de descoloração redutiva de azo-corantes. (a) via direta enzimática; e (b) via indireta catalisada por mediador redox. DE = doador de elétrons; DE<sub>ox</sub> = doador de elétrons oxidado; B = bactéria; MR<sub>ox</sub> = mediador redox oxidado; MR<sub>red</sub> = mediador redox reduzido.



Adaptado de Van Der Zee et al. (2003).

### 3.6.2. Degradação de corantes azo por microrganismos produtores de enzimas modificadoras da lignina

A degradação de corantes recalcitrantes por microrganismos produtores de EMLs tem sido estudada por diversos autores (Adnan et al., 2015; Bourbonnais et al., 1997; Khlifi et al., 2010; Tan et al., 2016; Wong e Yu, 1999). Fungos ascomicetos e de podridão branca têm demonstrado boa performance na degradação de corantes azo e de seus subprodutos, por produzirem uma imensa variedade de enzimas não-específicas, normalmente associadas à decomposição da matéria orgânica complexa (Khlifi et al., 2010; Kues, 2015; Tan et al., 2016; Wong e Yu, 1999). A atividade dessas enzimas também foi observada em diversas estirpes de bactérias (Galai et al., 2009; Phugare et al., 2011; Saratale et al., 2013; Telke et al., 2010).

A degradação do azo por esses microrganismos ocorre pela ação de enzimas oxidases e redutases, sendo que o efeito sinérgico entre elas é destacado em alguns estudos (Phugare et al., 2011). A descoloração mediada por EMLs (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase), muitas vezes em associação com outras enzimas não-específicas (tirosinase, DCIP-NADH redutase e álcool veratrílico oxidase), foi observada por diversos autores (Adnan et al., 2015; Khlifi et al., 2010; Kurade et al., 2017; Leung e Pointing, 2002; Phugare et al., 2011; Roriz et al., 2009; Sen et al., 2016; Tan et al., 2016; Telke et al., 2010).

### 3.7. Utilização de consórcios microbianos no tratamento de corantes azo

Em co-cultura, os microrganismos podem se beneficiar da produção de metabólitos por outras espécies, e por isso os consórcios microbianos são mais resilientes às variações ambientais e ao estresse nutricional (Brenner et al., 2008). Benomar et al. (2015) observaram uma relação sinérgica entre duas espécies de bactérias em que, na ausência de nutrientes essenciais, ocorria troca de material citoplasmático entre os indivíduos. A comunicação induzia a modificações na expressão gênica das células e à emergência de novos fenótipos no consórcio.

No âmbito do tratamento biológico de azo-corantes, interações similares foram observadas. Kurade et al. (2017) constataram que os microrganismos de um consórcio bactéria-leveduras produziram mais enzimas quando em associação, se comparado à produção enzimática das mesmas espécies isoladamente. Phugare et al. (2011) também reportaram a eficiência do uso de consórcios na degradação de um efluente de indústria têxtil, demonstrando que um consórcio formado por dois tipos de bactérias propiciou melhor descoloração do efluente que as culturas individuais, reduzindo significativamente a ecotoxicidade dessa AR. Conclusões similares foram obtidas por Khehra et al. (2005) ao comparar o desempenho de um consórcio artificial à eficiência de descoloração de diversos corantes azos pelas respectivas culturas puras.

Em suma, a maioria dos trabalhos envolvendo a biodegradação de compostos azo fazem uso de culturas puras ou de consórcios artificiais. Esta abordagem – que está historicamente associada à biotecnologia industrial – é pouco viável no contexto da biotecnologia ambiental que visa ao tratamento de resíduos, principalmente devido aos requisitos de esterilidade (Kleerebezem e van Loosdrecht, 2007). Kleerebezem e Van Loosdrecht (2007) utilizam o conceito de *Biotecnologia de cultura mista*<sup>4</sup> para referir-se à aplicação de culturas indeterminadas em sistemas biológicos. A técnica não requer o isolamento prévio das culturas utilizadas e, portanto, o rendimento do processo é controlado por intermédio de alguns fatores-chaves, e.g. fonte do inóculo e condições ambientais para seleção dos microrganismos de interesse.

### 3.8. Aeração intermitente aplicada à biodegradação de aminas aromáticas

As aminas aromáticas e outros intermediários gerados no processo de descoloração reductiva são recalcitrantes ao tratamento anaeróbio, de modo que muitos autores optam por um

---

<sup>4</sup> Tradução livre do inglês *Mixed culture biotechnology*

pós-tratamento aeróbio para remoção destes compostos (Amaral et al., 2014; Amorim et al., 2013; Braúna et al., 2009; Gavazza et al., 2015; Imran et al., 2016; Sharma et al., 2016; Talarposhti et al., 2001). A aplicação de aeração intermitente para a remoção de cor, que será testada neste estudo, é uma alternativa aos processos convencionais anaeróbio-aeróbios e visa à descoloração e biodegradação de metabólitos no mesmo compartimento reacional.

A estratégia foi previamente utilizada em um único estudo de conhecimento do autor, em que se constatou que reatores sujeitos à microaeração descontínua produziram um efluente com menor ecotoxicidade aguda à *D. magna* quando comparado ao efluente tratado em ambiente estritamente anaeróbio (Menezes, 2016). Estes resultados são importantes porque abrem espaço a novos caminhos no âmbito do tratamento biológico de ARs do setor têxtil.

### **3.9. Considerações parciais**

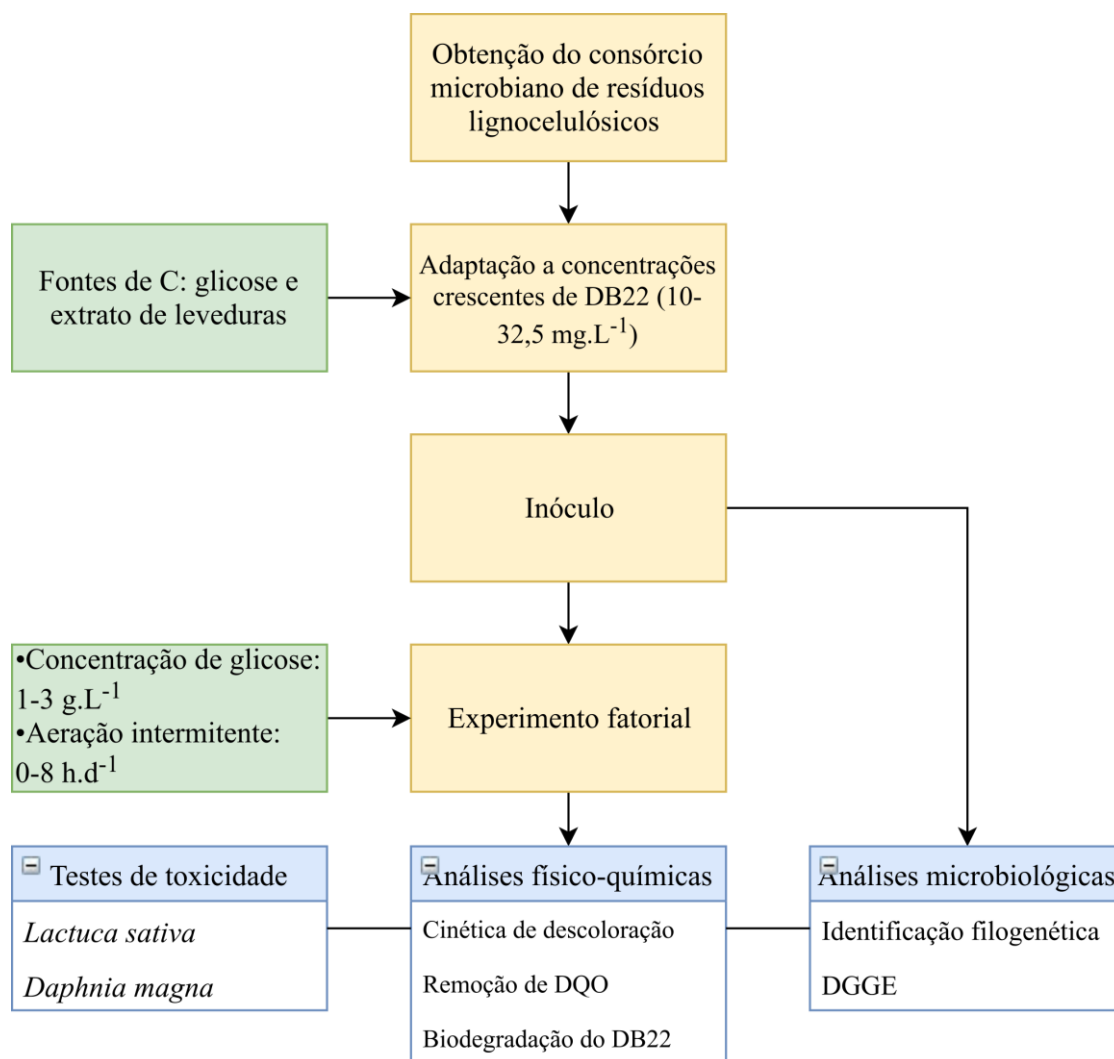
Os fatores que afetam a biodegradação de corantes azo em processos com utilização de aeração intermitente são pouco conhecidos. A frequência de aeração, fonte de carbono orgânico, concentração inicial de co-substrato e fatores ambientais, e.g. pH e temperatura, são variáveis que possivelmente interferem no processo. Neste trabalho, o nível de aeração intermitente e a concentração inicial de glicose foram selecionados como variáveis de estudo, com a finalidade de entender como a disponibilidade de equivalentes redutores e a respiração aeróbia afetam o balanço de elétrons destinados aos vários processos, entre eles a descoloração do DB22 e mineralização dos subprodutos.

#### 4. MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado em duas etapas principais, a saber: A) obtenção dos microrganismos e adaptação do consórcio ao DB22; e B) estudo dos efeitos da aeração intermitente e concentração inicial de glicose sobre diversos processos envolvidos na biodegradação do DB22 por intermédio de planejamento fatorial.

No estudo fatorial, as principais respostas avaliadas foram: i) remoção de cor e cinética de descoloração; ii) análise qualitativa da presença de aminas aromáticas no tempo final do experimento; iii) remoção de DQO; iv) caracterização microbiana por sequenciamento do gene 16S rRNA e DGGE; e v) ensaios ecotoxicológicos com sementes de *L. sativa* e microcrustáceo *D. magna*. O diagrama da **Figura 4.1** apresenta informações referentes às etapas do estudo e respectivas análises realizadas para monitoramento e conhecimento dos processos.

**Figura 4.1.** Diagrama com informações acerca de etapas do estudo e principais análises realizadas.



## 4.1. Efluente têxtil sintético

### 4.1.1. Corante e processo de hidrólise

O DB22 (CAS 6473-13-8) foi utilizado como corante azo modelo. O composto cedido pela empresa Exatacor Araquímica Ind. e Com. de Corantes (Recife, PE) possuía peso molecular de  $1083,97 \text{ g.mol}^{-1}$  e pureza de 50% (informação pessoal<sup>5</sup>). A hidrólise foi realizada de acordo com o método descrito por Santos et al. (2004), simulando o processo comumente realizado industrialmente. O método consiste na elevação do pH da solução de corante com NaOH 20% (m.m<sup>-1</sup>) até o pH 11 e subsequente aquecimento da mistura a 85°C por 1 hora sob agitação. Após resfriada, a solução foi neutralizada com adição de HCl ( $6 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

### 4.1.2. Constituintes da água residuária

A AR sintética foi preparada de forma a prover os compostos comumente encontrados em efluentes industriais têxteis (Amaral et al., 2017, 2014; Amorim et al., 2013; Dos Santos et al., 2005; Ferraz et al., 2011; Kurade et al., 2017; Phugare et al., 2011; Telke et al., 2010). Visto que este trabalho parte de uma parceria cujo objetivo é viabilizar o tratamento de resíduos gerados em lavanderias localizadas no polo industrial de Caruaru – PE, os estudos desenvolvidos nessa região foram especialmente ponderados na composição do efluente simulado.

A AR era composta de: DB22 ( $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), glicose ( $1,0\text{-}3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ ) e NaCl ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Ademais, foram adicionados extrato de levedura ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) como fonte de nitrogênio e  $\text{NaHCO}_3$  (1:1 g-glicose) como fonte de alcalinidade. Os elementos traços foram fornecidos pela adição de uma alíquota de  $1 \text{ mL.L}^{-1}$  de solução de elementos traços com a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (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),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (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).

## 4.2. Fonte de microrganismos

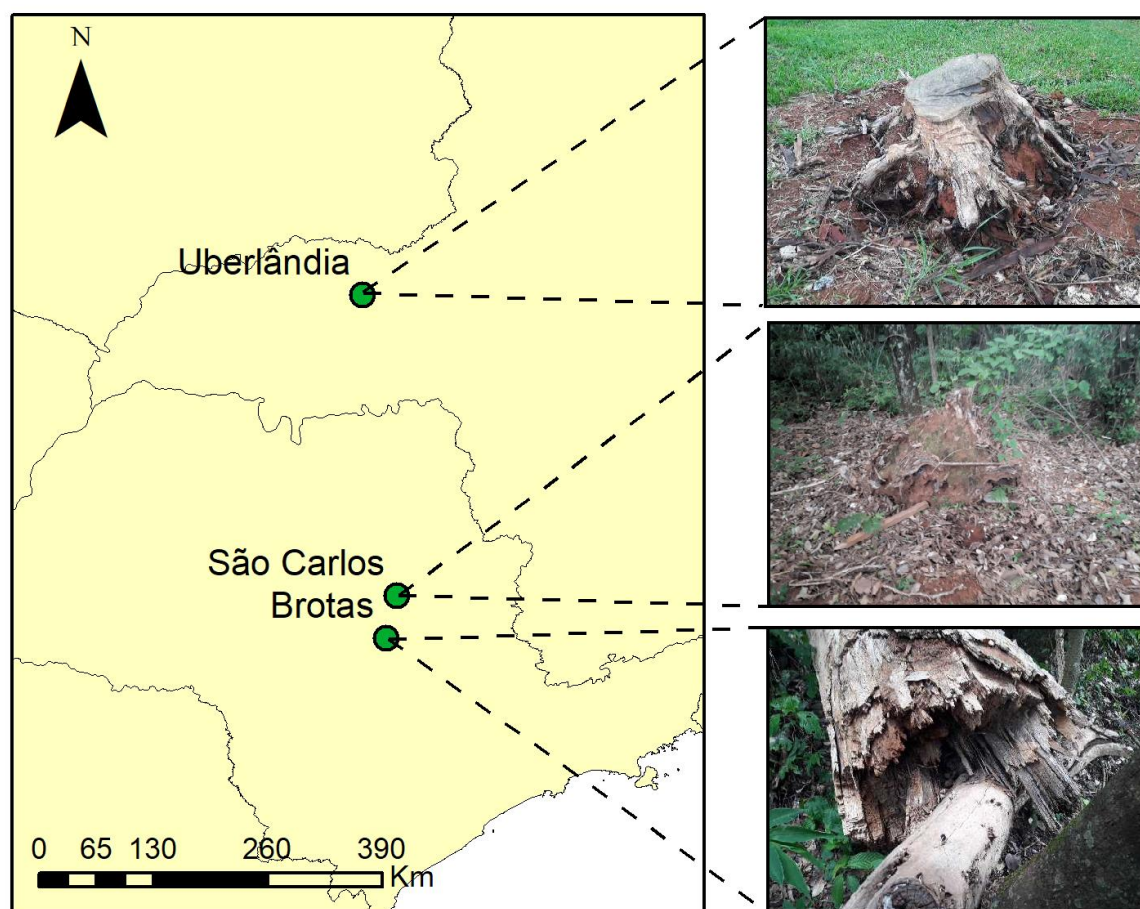
Os microrganismos foram obtidos a partir de material lignocelulósico – madeira pútrida e solo de regiões naturais. Os solos florestais já foram utilizados para obtenção de microrganismos ligninolíticos (Bandounas et al., 2011; Huang et al., 2013). Ademais, resíduos lignocelulósicos e solos contaminados com efluente da indústria têxtil são materiais já utilizados previamente como fonte de culturas degradadoras de corantes da classe azo (Adnan

---

<sup>5</sup> Gavazza, S.S.P. Mensagem recebida por e-mail em 03 de nov. de 2018.

et al., 2015; Seesuriyachan et al., 2007; Senan e Abraham, 2004; Telke et al., 2010). As coletas foram realizadas em três pontos distintos geograficamente para obter maior diversidade microbiana, a saber: Parque do Sabiá, localizado no município de Uberlândia – MG; Bosque de Pinnus da UFSCar, situado no distrito de São Carlos – SP; e Fazenda Cassorova, no município de Brotas – SP. Os detalhes estão discriminados na **Figura 4.2** e **Quadro 4.1**.

**Figura 4.2.** Representação espacial de pontos de coleta de material lignocelulósico e solo utilizados como fonte de microrganismos. Datum: WGS 1984.



**Quadro 4.1.** Detalhes sobre pontos de coleta de material lignocelulósico para obtenção de consórcio microbiano.

Ponto de Coleta	Município	Material coletado	Coordenadas	
			Latitude	Longitude
Fazenda Cassorova	Brotas - SP	Madeira pútrida de árvore caída e solo adjacente	22° 24' 49,4" S	47° 59' 39,8" W
Bosque de Pinnus da UFSCar	Sao Carlos - SP	Solo adjacente a resíduos de madeira	21° 59' 5,3" S	47° 53' 0,9" W
Parque do Sabiá	Uberlândia - MG	Solo adjacente a resíduos de madeira	18° 54' 44,3" S	48° 14' 18,5" W

### 4.3. Obtenção e enriquecimento do consórcio microbiano

Os microrganismos obtidos de material lignocelulósico foram enriquecidos em meio de cultura (MC, pH 9,6) adaptado de Senan e Abraham (2004). O meio era composto de glicose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), extrato de leveduras ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ) e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ). O material de inóculo – solo com resíduos de madeira advindos de diversas regiões naturais (**Quadro 4.1**) – foi misturado em partes iguais e tratado conforme procedimento descrito por Bandounas et al (2011). Resumidamente, 5 g do material foi suspenso em 100 mL de NaCl 0,9% (m/v) e a solução resultante foi incubada sob agitação a  $30^\circ\text{C}$  e 200 rpm por período de 1 h. Posteriormente, uma alíquota de 5 mL da solução foi transferida para um frasco de erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL de MC. Ademais, adicionou-se uma lasca de madeira pútrida (Fazenda Cassorova) com dimensões de aproximadamente  $2 \times 2 \text{ cm}$ . As culturas foram incubadas no escuro a  $30^\circ\text{C}$  e em condições estáticas, i.e. sem agitação, por período de 24 h.

Para adaptação do consórcio ao corante estudado, uma alíquota de 1 mL do meio cultivado foi transferida para MC fresco contendo  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de DB22. Em um período de 20 dias, foram realizadas sucessivas transferências para meio com concentrações crescentes do corante, a saber: 10, 15, 20, 25 e  $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . O consórcio obtido foi enriquecido por um período adicional de cinco dias, durante o qual foram realizadas trocas diárias do meio de crescimento utilizando a concentração de DB22 de  $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . O consórcio microbiano obtido era capaz de descolorir o meio de cultura em um período de aproximadamente 12 h.

Neste trabalho, não foi identificada a presença de fungos no consórcio (**Figura A.1** do Apêndice A). Possivelmente, o elevado valor de pH do meio de cultura (pH 9,6) e curto intervalo entre as repicagens (24-48 h) possibilitou o estabelecimento de bactérias com rápido crescimento em detrimento dos organismos eucariotos.

### 4.4. Preparo de inóculo

O consórcio microbiano obtido foi preservado com glicerina em alíquotas para padronização do inóculo dos ensaios subsequentes (Hollander et al., 1954). Para isso, 210 mL de cultura de 24 h ( $2,55 \text{ g-SSV.L}^{-1}$ ) foram centrifugados a 9000 rpm por 5 min para recuperação da biomassa e descarte do decantado. Os microrganismos foram lavados em solução de NaCl 0,9% (m.v<sup>-1</sup>) para remoção de metabólitos e suspensos em 210 mL de solução contendo glicerina 50% (v.v<sup>-1</sup>) e MC 50% (v.v<sup>-1</sup>). Foram preparadas alíquotas de 2 mL da solução obtida

em tubos de eppendorf e as partes foram armazenadas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em congelador de ultra-baixa temperatura (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA).

Previamente ao uso como inóculo das bateladas, os microrganismos foram lavados em solução de NaCl 0,9% ( $\text{m.v}^{-1}$ ) e pré-cultivados em 100 mL de MC a  $30^{\circ}\text{C}$  e em condições estáticas, i.e. sem agitação, por período de 24 h. As culturas pré-cultivadas renderam uma produção média de biomassa de  $2,7 \text{ g-SSV.L}^{-1}$ . As células foram lavadas com água deionizada previamente à inoculação dos experimentos.

#### 4.5. Planejamento experimental aplicado à degradação do DB22 e de subprodutos

##### 4.5.1. Planejamento fatorial completo

Os efeitos da concentração de glicose ( $X_1$ ) e aeração intermitente ( $X_2$ ) sobre as variáveis respostas descoloração final ( $Y_1$ ), taxa constante de descoloração ( $Y_2$ ) e remoção de DQO ( $Y_3$ ) foram investigados por meio de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta (RSM, do inglês *response surface methodology*). O método utilizado foi o planejamento fatorial completo (FFD, do inglês *full factorial design*)  $3^2$  – três níveis ( $n$ ) e dois fatores ( $k$ ) – com duas repetições, totalizando 18 ensaios. O estudo em três níveis foi realizado a fim de que se pudesse observar e analisar a curvatura da superfície de resposta (Jones e Nachtsheim, 2011). Para um número de níveis superior a dois, o delineamento composto central rotacional (DCCR) tem sido considerado uma alternativa mais eficiente ao FFD por permitir a obtenção de resultados de boa qualidade com um menor número de ensaios. Entretanto, nestas condições, obter-se-ia valores para níveis de aeração de difícil operabilidade. Ademais, com a realização de duas repetições em experimentos de apenas dois fatores, o número de ensaios no FFD passa a ser similar ao de um DCCR (9 pontos fatoriais + 6 pontos axiais + número arbitrário de pontos centrais).

A concentração de glicose foi estudada na faixa de 1 a  $3 \text{ g.L}^{-1}$  e a aeração intermitente na faixa de 0 a  $8 \text{ h.d}^{-1}$ . Os fatores  $X_1$  e  $X_2$  foram tratados como variáveis contínuas representadas pelos códigos -1, 0 e 1 para os fins de cálculo, como demonstrado no **Quadro 4.2**. As combinações do FFD são apresentadas no **Quadro 4.3**.

**Quadro 4.2.** Valores utilizados no FFD para estudo da remoção de cor, DQO e toxicidade de água residuária sintética com corante DB22.

Fatores	Código	-1	0	1
1. Glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$X_1$	1	2	3
2. Aeração ( $\text{h.d}^{-1}$ )	$X_2$	0	4	8



**Quadro 4.3.** Matriz do FFD codificada com nove condições experimentais e duas repetições, totalizando 18 ensaios.

Número de execução do ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	1
4	0	-1
5	0	0
6	0	1
7	1	-1
8	1	0
9	1	1
10	-1	-1
11	-1	0
12	-1	1
13	0	-1
14	0	0
15	0	1
16	1	-1
17	1	0
18	1	1

#### 4.5.2. Modelo empírico e superfície de resposta

Os resultados do experimento fatorial foram utilizados para a construção de um modelo quadrático com interações de primeira ordem. De acordo com Rodrigues e Lemma (2014), o modelo pode ser representado pela **Eq. 4.1**:

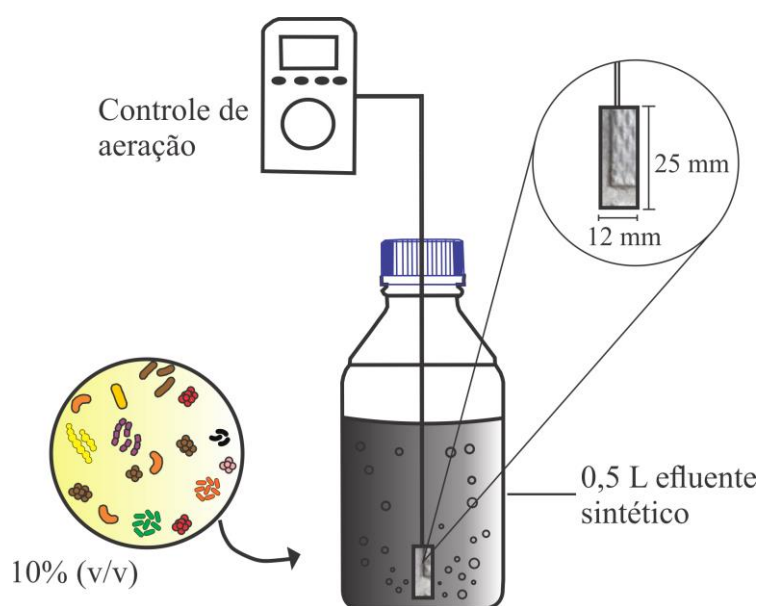
$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + e \quad (4.1)$$

Na Eq. 1:  $\beta_0$  é o termo constante;  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$  e  $\beta_{22}$  e  $\beta_{12}$  representam, respectivamente, os efeitos lineares, quadráticos e interativo dos fatores; e  $e$  é o termo de erro. A qualidade do ajuste do modelo quadrático foi testada por meio do método de Análise de Variância (ANOVA) realizado na plataforma Protimiza Experimental Design (Campinas, Brasil). Os coeficientes não significativos ( $p > 0,1$ ) foram eliminados e os parâmetros do modelo foram recalculados. O p-valor utilizado foi de 0,10 devido à grande variabilidade existente em experimentos que utilizam microrganismos (Rodrigues and Lemma, 2014). A superfície de resposta contendo apenas os coeficientes significativos foi gerada com o auxílio do software Statistica Enterprise (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

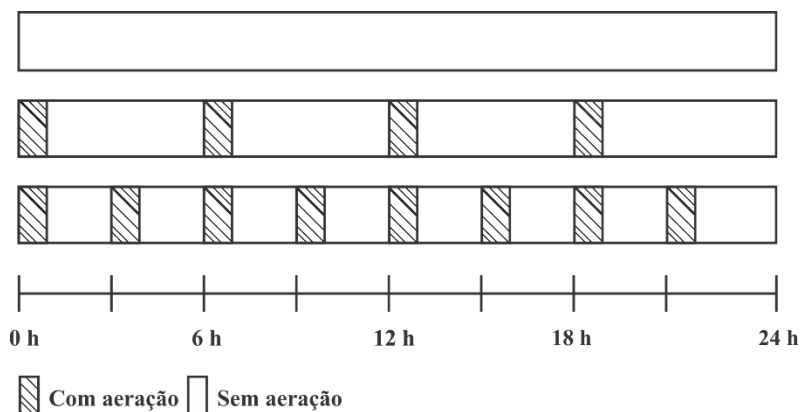
#### 4.6. Operação das bateladas

Os ensaios foram realizados em frascos de Duran® (1 L) contendo 0,5 L de efluente sintético e headspace de 50% conectado à atmosfera. As bateladas foram inoculadas com o correspondente a 10% (v.v<sup>-1</sup>) da biomassa microbiana previamente ativada (**Figura 4.3**). Nos ensaios com aeração intermitente, foi utilizada a seguinte estratégia: 4 ou 8 ciclos de aeração por dia, com duração de 1 h cada, igualmente espaçados no período de 24 h (**Figura 4.4**). Todos os experimentos foram realizados a 30°C.

**Figura 4.3.** Esquema de operação das bateladas. Experimentos inoculados com 10% (v/v) do consórcio microbiano pré-cultivado por 24 h e sujeitos à aeração intermitente controlada por temporizador digital.



**Figura 4.4.** Estratégia de aeração intermitente utilizada nos ensaios. A aeração foi providenciada por meio de bomba aeradora modelo Big Air A320 a uma vazão de 2,5 L/min. Foi utilizada uma pedra porosa (12x25 mm) para facilitar a difusão do ar no meio líquido. Os ciclos de aeração possuíam duração de 1 h.



## 4.7. Análises físico-químicas

### 4.7.1. Cor, pH, DQO, SSV e Alcalinidade

Os parâmetros de monitoramento das bateladas estão indicados no **Quadro 4.4**. As análises de pH, DQO e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram realizadas de acordo com protocolos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2005). A cor das amostras foi determinada pelo método do registro do espectro visível (APHA/AWWA/WEF, 2005; Wu et al., 1998). As amostras foram previamente diluídas em solução tampão fosfato (10,86 g.L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 5,98 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em proporção 1:1 e pré-tratadas para remoção de turbidez (Firmino et al., 2010). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro Nanocolor UV/VIS II (Macherey Nagel, Düren, Alemanha) nos comprimentos de onda de 400 a 700 nm. A alcalinidade foi determinada pelo método de Dilallo e Albertson (1961), modificado por Ripley e Boyle (1986).

**Quadro 4.4.** Métodos analíticos utilizados no monitoramento do processo de biodegradação do DB22 em reatores de batelada.

Parâmetro	Método	Referências
Cor	Registro do espectro	Wu et al. (1998); APHA (2005)
pH	Potenciométrico	APHA (2005)
DQO	Espectrofométrico	APHA (2005)
SSV	Gravimétrico	APHA (2005)
Alcalinidade	Titulométrico	Ripley e Boyle (1986)

### 4.7.2. Biodegradação do DB22 e produção de aminas aromáticas

A biodegradação do DB22 foi monitorada por espectrofotometria UV-VIS (Pinheiro et al., 2004). As amostras receberam tratamento similar àquele dos ensaios de determinação de cor e a leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 200 a 800 nm. A presença de aminas aromáticas foi qualitativamente avaliada na região de varredura do espectro de 200 a 350 nm.

### 4.7.3. Cinética de degradação

A cinética de biodegradação do DB22, nos reatores de batelada, foi investigada. Para efeitos de simplificação, considerou-se que as reações se aproximam do modelo usual de primeira ordem, observando-se as condições a seguir.

Considere-se a reação estequiométrica simples abaixo:



Onde:  $C$  é o contaminante;  $D$  é o composto orgânico doador de elétrons da reação;  $E$  corresponde à enzima biológica que catalisa a reação de degradação; e  $P$  são os subprodutos da reação.

Visto que os processos biológicos são intermediados por enzimas biológicas, temos que, para um reator de batelada ideal, a taxa de reação ( $r_C$ ) pode ser descrita como uma equação de Monod (Levenspiel, 1998):

$$-r_C = -\frac{dC}{dt} = k \frac{C_C}{C_C + K_{MC}} \frac{C_D}{C_D + K_{MD}} \quad (4.3)$$

Onde:  $t$  é o tempo de reação;  $C_C$  é a concentração do contaminante;  $C_D$  é a concentração do doador de elétrons;  $K_{MC}$  e  $K_{MD}$  são as constantes de meia saturação relacionadas à afinidade das enzimas biológicas pelo contaminante e doador de elétrons, respectivamente; e  $K$  é uma constante que depende de vários fatores, e.g. temperatura, presença de elementos traços, entre outros.

Nos casos em que o doador de elétrons se encontra em excesso, porém, a taxa de reação é limitada apenas pela concentração do contaminante. Deste modo, a Eq. 4.3 pode ser reescrita como:

$$-r_C = k \frac{C_C}{C_C + K_{MC}} \quad (4.4)$$

Assumindo que o contaminante é um composto recalcitrante e, portanto,  $K_{MC} \gg C_C$ , a taxa de reação se aproxima de uma cinética de primeira ordem:

$$-r_C = K_1 C_C \quad (4.5)$$

Onde:  $K_1$  é a constante de primeira ordem da reação.

Para efeitos de comparação entre os diferentes tratamentos realizados, bem como de simplificação dos cálculos, o modelo de primeira ordem foi utilizado para ajuste dos dados em todas os experimentos. Entretanto, neste estudo, deve-se considerar que: a) a concentração do co-substrato doador de elétrons é variável; e b) o aumento dos níveis de aeração intermitente gera uma demanda por equivalentes de redução, pela respiração aeróbia, que não está associada à degradação do corante. Em virtude disso, para baixas concentrações de co-substrato e níveis superiores de aeração intermitente, o ajuste dos dados a um modelo de pseudo-primeira ordem

será menos apropriado, pois o doador de elétrons não se encontrará, necessariamente, em excesso.

#### **4.8. Análises microbiológicas**

##### **4.8.1. Morfologia dos microrganismos**

Para conferir a morfologia e integridade das células cultivadas, i.e. consórcio microbiano adaptado DB22, foi realizada análise de microscopia ótica de contraste de fase. A ferramenta utilizada foi um microscópio ótico modelo Olympus BX60 com uma câmera digital Olympus DP74 acoplada.

##### **4.8.2. Amostragem, extração e integridade do DNA genômico**

O efluente dos reatores em batelada foi centrifugado (9000 rpm, 5 min) para a recuperação da biomassa microbiana suspensa. O pellet formado foi lavado em tampão PBS 1X para remoção de impurezas e preservado a -20°C até a extração. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o conjunto FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA foram avaliadas utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), constatando-se que todas as amostras possuíam relação entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) na faixa de 1,8 a 2,0, que é um bom indicativo da pureza dos ácidos nucleicos (Desjardins and Conklin, 2011). Ademais, nas amostras enviadas para sequenciamento do gene 16S rRNA, a integridade do DNA foi avaliada por procedimento de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Silva et al., 2003), tendo sido constatado que as amostras de DNA genômico eram íntegras, possuindo tamanhos na ordem de 10.000 pb<sup>6</sup>.

##### **4.8.3. Sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA**

A identificação filogenética dos microrganismos (inóculo e experimentos E-02 e E-04) foi realizada a partir da amplificação e caracterização de fragmentos do gene 16S rRNA por técnica de sequenciamento metagenômico. Os experimentos sequenciados foram escolhidos com base em critérios como velocidade de descoloração, DQO residual e grau de mineralização do DB22.

Foram utilizados os primers universais 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) e 806R (GGACTACNNGGTATCTAAT) para amplificação do 16S DNAr de Bacteria. O preparo de

---

<sup>6</sup> A verificação foi realizada com o auxílio do padrão *High DNA mass ladder Invitrogen*.

biblioteca foi realizado com utilização do kit NEBNext ® Ultra DNA Library Pre Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A biblioteca foi sequenciada na plataforma Illumina HiSeq 2000 e leituras pareadas de 250 pb foram geradas.

As leituras foram montadas e filtradas (QPhred  $\geq 33$ ) para a remoção de sequências contendo bases de baixa qualidade. Quimeras foram detectadas (UCHIME algorithm) e eliminadas. Após o alinhamento das sequências, utilizou-se o algoritmo UPARSE-OTU para a determinação de unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês *operational taxonomic units*)<sup>7</sup> com 97% de similaridade. A classificação taxonômica das OTUs foi realizada com o RDP classifier (Ribossomal Database Project; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

As sequências de nucleotídeos foram depositadas no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e está disponível sob o número de acesso PRJNA521536.

#### 4.8.4. Reação em cadeia da polimerase, eletroforese em gel de gradiente desnaturante e análise multivariada do perfil de bandas

As regiões V6-V8 do gene 16S rRNA de bactérias foram previamente amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) com utilização dos primers 968FGC e 1401R (Nübel et al., 1996). Foi utilizado termociclador modelo Eppendorf AG – 22331 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) cuja programação é descrita no **Quadro 4.6**. Os produtos da PCR foram testados por eletroforese em gel de agarose 1,2% utilizando como referência o padrão *Low DNA Mass Ladder Invitrogen*. Os fragmentos de DNA possuíam tamanhos na ordem de 400 pb – valor aproximado da região do 16S rDNA alvo da amplificação.

**Quadro 4.5.** 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'
1401R	5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'

<sup>7</sup> Organismos agrupados com base no critério de similaridade das sequências do gene 16S rRNA.

**Quadro 4.6.** Programação do termociclador utilizado durante PCR para amplificação das regiões V6-V8 do 16S rDNA do domínio Bacteria.

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
95°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
7'	45"	45"	1'	10'	
←----- 35 ciclos ----->					

A DGGE foi realizada de acordo com protocolo de Muyzer et al. (1993). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) com gradiente desnaturante de 45 a 65%. O teste foi realizado a 60°C, com tensão de 75 V, por período 16 h. O gel foi corado com brometo de etídio e as leituras do padrão de bandas foram realizadas com o uso do trans-illuminador UV modelo Eagle Eye II (Stratagene California, San Diego, EUA). As análises multivariadas do perfil de bandas foram realizadas com o auxílio do software BioNumerics 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). A similaridade entre as amostras foi calculada pela técnica do Coeficiente de Correlação de Pearson e o dendograma foi construído utilizando o algoritmo UPGMA (do inglês *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*).

#### 4.8.5. Cálculo de índices ecológicos

Os índices de diversidade, dominância e riqueza relativa foram calculados com base no número e intensidade relativa das bandas do DGGE. Nas amostras sequenciadas, os índices foram obtidos com base no número de sequências das OTUs com 97% de similaridade. O software utilizado para os cálculos foi o PAST 3 (University of Oslo, Oslo, Noruega).

A diversidade de populações foi estimada com base no índice de Shannon (H), calculado a partir da seguinte equação (Magurran, 1983):

$$H = - \sum \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n} \quad (4.6)$$

Sendo  $n$  o número total de indivíduos; e  $n_i$  o número de indivíduos do táxon  $i$ .

O cálculo da Dominância (D) utiliza a relação a seguir (Hammer et al., 2001):

$$D = \sum \left( \frac{n_i}{n} \right)^2 \quad (4.7)$$

O indicador da riqueza utilizado foi o estimador Chao-1 ( $S_1$ ), que considera o número de populações raras na amostra acrescido de um termo que traduz a possibilidade de encontrar novas populações não descobertas (Chao e Lee, 1992):

$$S_1 = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2 F_2} \quad (4.8)$$

Sendo  $S_{obs}$  o número de populações na amostra;  $F_1$  o número de *singletons*, i.e. populações com uma única ocorrência na amostra; e  $F_2$  o número de *doubletons*, i.e. populações com apenas duas ocorrências na amostra.

#### 4.9. Ensaios ecotoxicológicos

##### 4.9.1. Testes com semente de *Lactuca sativa*

Foram conduzidos testes de toxicidade aguda do efluente não-tratado e tratado utilizando sementes de *L. sativa*. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada uma das réplicas das diferentes condições avaliadas, i.e., seis testes para cada condição. Ademais, foram realizados ensaios preliminares, em sextuplicata, com os componentes inorgânicos da água residuária sintética (**Quadro 4.7**) para avaliar a toxicidade motivada pela concentração do sal empregado como fonte de alcalinidade. O bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) foi utilizado na proporção de 1 g de  $\text{NaHCO}_3$  por g de glicose.

O método utilizado foi o do alongamento da radícula, conforme protocolo da Empresa de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – EPA, com adaptações (EPA, 1989; Priac e Badot, 2017). As placas de petri de 90 mm foram revestidas com uma camada dupla de papel filtro qualitativo ( $85 \text{ g/m}^2$ ) previamente esterilizado e um total de cinco sementes foram dispostas igualmente espaçadas sobre o papel umedecido com 4 mL da amostra teste. As tampas foram revestidas com papel filtro umedecido com 2 mL de amostra para evitar a perda de umidade. As placas foram seladas e mantidas no escuro a  $24.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  por 120 h. Novos testes foram realizados, em sextuplicata, para as condições experimentais que se destacaram com base em critérios específicos. Os novos ensaios foram realizados com um total de dez sementes por placa.

Os parâmetros de reposta avaliados foram a taxa de germinação (GR, do inglês *germination rate*) e o índice de germinação (GI, do inglês *germination index*), calculados pelas equações a seguir (Priac e Badot, 2017):

$$\text{GR (\%)} = \frac{\text{GSS}}{\text{GSC}} \times 100 \quad (4.9)$$

$$\text{GI} = \frac{\text{RLS} \times \text{GSS}}{\text{RLC} \times \text{GSC}} \quad (4.10)$$

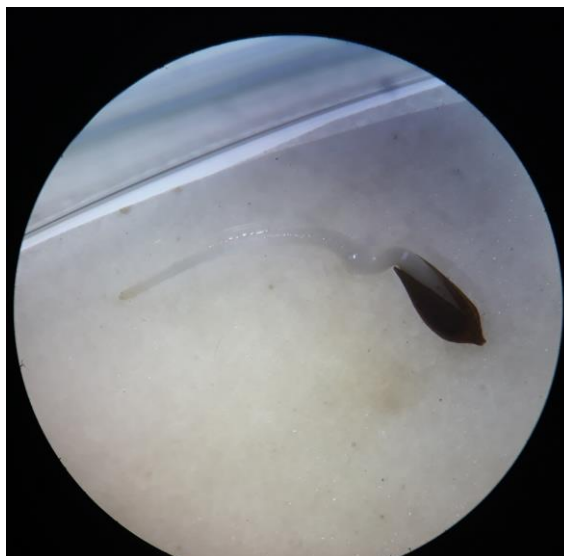


Sendo *GSS* e *GSC* o número de sementes germinadas na amostra de efluente e controle, respectivamente; e, de modo análogo, *RLS* e *RLC* são o comprimento total da radícula na amostra de efluente e controle.

**Quadro 4.7.** Principais características dos experimentos de toxicidade realizados com sementes de *L. sativa*.

Experimento	Composição da AR	Réplicas/condição	Sementes/réplica
Efeito de componentes inorgânicos	NaHCO <sub>3</sub> (1-3 g.L <sup>-1</sup> ), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,25 g.L <sup>-1</sup> ), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,50 g.L <sup>-1</sup> ) e NaCl (0,50 g.L <sup>-1</sup> ).	6	5
Efeito da concentração de glicose na AR bruta	Glicose (1-3 g.L <sup>-1</sup> ), NaHCO <sub>3</sub> (1-3 g.L <sup>-1</sup> ), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,25 g.L <sup>-1</sup> ), Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,50 g.L <sup>-1</sup> ), NaCl (0,50 g.L <sup>-1</sup> ) e DB22 (32,5 mg.L <sup>-1</sup> ).	6	5
Efeito do tratamento biológico (E-01 a E-09)	AR sintética tratada biologicamente	6	5
Efeito do tratamento biológico (E-02 e E-04)	AR sintética tratada biologicamente	6	10

**Figura 4.5.** Semente germinada de *L. sativa*.



Fonte: acervo pessoal do autor.

#### 4.9.2. Testes com *Daphnia magna*

Os ensaios de toxicidade aguda ao microcrustáceo *D. magna* foram realizados de acordo com procedimentos descritos na NBR 12.713 (ABNT, 2016). Os neonatos com idade inferior a 24 h foram expostos às várias diluições das amostras de interesse por período de 48 h, sem alimentação. Os ensaios foram mantidos em incubadora B.O.D. modelo SL-200/120 (Solab, Piracicaba, Brasil) com temperatura controlada de 18°C e fotoperíodo de 16 h. Foram utilizados um total de trinta organismos-teste por amostra, distribuídos em três réplicas. Os efeitos foram contabilizados a partir da concentração efetiva que causa mortalidade ou imobilidade em 50% dos indivíduos (CE<sub>50</sub>/DIL). As concentrações foram baseadas em proporções de diluição do efluente (100%, 75%, 50%, 25%, 10%), conforme sugerido pelo protocolo da Environment Canada (2007) para testes com múltiplas concentrações.

A CE<sub>50</sub> foi obtida por interpolação gráfica após o ajuste de uma função log-logística (3P) aos dados experimentais. Os cálculos foram executados na plataforma R 3.5.2 (R Development Core Team, 2018, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

Para verificar a validade estatística dos resultados, foram realizados ensaios de sensibilidade do lote de organismos-teste. A substância referência utilizada foi o sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)<sup>8</sup>.

#### 4.9.3. Análise estatística

A aderência dos dados à distribuição normal foi verificada por meio do teste estatístico de Shapiro-Wilk. Os valores de GR foram comparados com teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou ANOVA, com base no critério de normalidade das amostras. O limite de significância utilizado foi de p<0,05. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software PAST 3 (University of Oslo, Oslo, Noruega).

---

<sup>8</sup> A CE<sub>50</sub> obtida foi de (0,025±0,000) mg.L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, estando dentro dos limites da carta-controle do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA-USP). Resultados disponíveis na **Figura B.1** do **Apêndice B**.

## 5. RESULTADOS

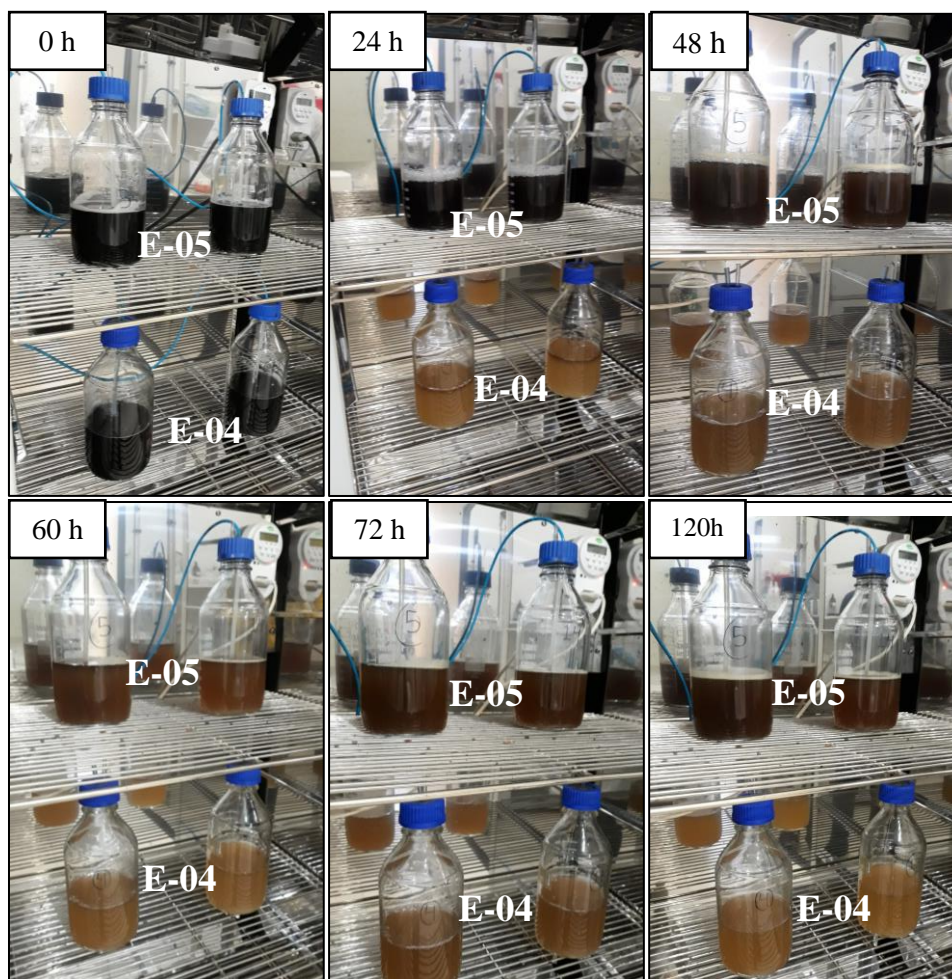
### 5.1. Planejamento fatorial completo

O planejamento fatorial foi conduzido para investigar os efeitos individuais e sinérgicos da concentração de glicose (1, 2 e 3 g.L<sup>-1</sup>) e aeração intermitente (0, 4 e 8 h.d<sup>-1</sup>) sobre as respostas descoloração (Y<sub>1</sub>), constante de descoloração (Y<sub>2</sub>) e remoção de DQO (Y<sub>3</sub>). A **Tabela 5.1** apresenta a relação de resultados médios de cada ensaio. O monitoramento das bateladas em função do tempo será objeto de análise nas seções 5.1.1 e 5.1.2. No item 5.2, os resultados serão discutidos a partir de uma abordagem diferente, onde serão tratados os aspectos referentes ao modelo empírico, superfície de resposta e significância dos fatores investigados.

**Tabela 5.1.** Resultados do planejamento fatorial 3<sup>2</sup> para investigar os efeitos da concentração de glicose (X<sub>1</sub>) e aeração intermitente (X<sub>2</sub>) na descoloração (Y<sub>1</sub>), constante de descoloração (Y<sub>2</sub>) e remoção de DQO (Y<sub>3</sub>) de efluente simulado contendo Direct Black 22. Médias de experimentos realizados em duplicata.

Ensaio	X <sub>1</sub> - Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> - Aeração (h.d <sup>-1</sup> )	Y <sub>1</sub> - Descoloração (%)	Y <sub>2</sub> - K (d <sup>-1</sup> )	Y <sub>3</sub> - Remoção de DQO (mg)
E-01	1	0	73,1	1,45	202
E-02	1	4	61,9	0,39	474
E-03	1	8	37,5	0,06	561
E-04	2	0	90,0	2,18	425
E-05	2	4	85,0	1,50	672
E-06	2	8	49,0	0,24	674
E-07	3	0	88,5	2,18	448
E-08	3	4	90,9	1,23	611
E-09	3	8	61,4	0,24	825

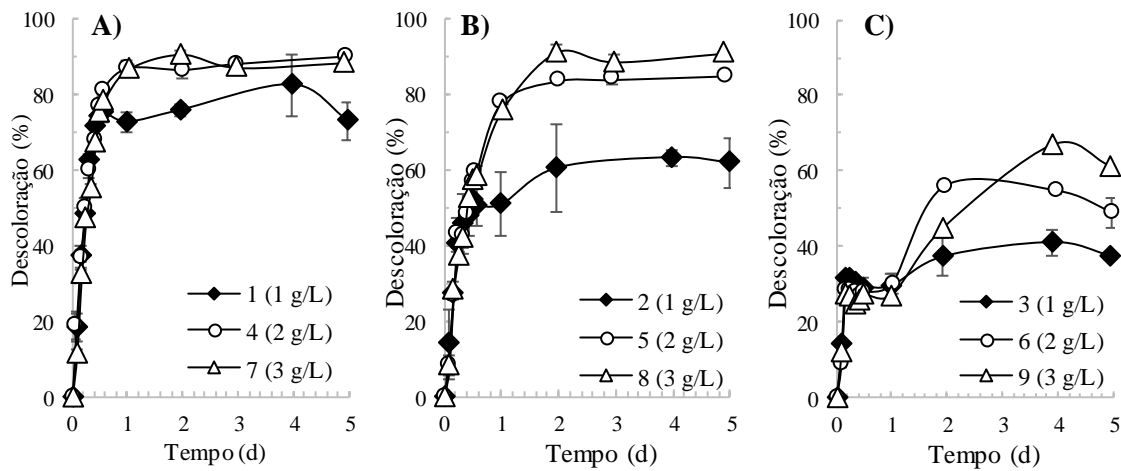
**Figura 5.1.** Verificação visual da descoloração da AR contendo DB22 ao longo do tempo em duplicatas de experimentos modelo, a saber: E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-05: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.



### 5.1.1. Efeitos da concentração de glicose

Os gráficos da **Figura 5.2** ilustram os efeitos da concentração inicial de glicose na descoloração do corante azo DB22 em função do tempo. As concentrações testadas foram de 1, 2 e 3 g.L<sup>-1</sup>. Nos experimentos não-aerados (i.e. 0 h.d<sup>-1</sup>), os reatores biológicos atingiram eficiências de remoção de cor satisfatórias a despeito do nível de glicose testado (**Fig. 5.2-A**). Para as concentrações de 2 e 3 g.L<sup>-1</sup>, a descoloração ao final do processo foi, em média, de 90 e 88,5%, respectivamente. O desempenho foi inferior para a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup>, onde a eficiência média obtida foi de 73,1%. Os ensaios com estratégias de aeração distintas seguiram padrão similar (**Fig. 5.2-B e 5.2-C**).

**Figura 5.2.** Efeitos da concentração de glicose na remoção de cor ao longo do tempo. Condições de aeração intermitente: A) 0 h.d<sup>-1</sup>; B) 4 h.d<sup>-1</sup>; e C) 8 h.d<sup>-1</sup>.

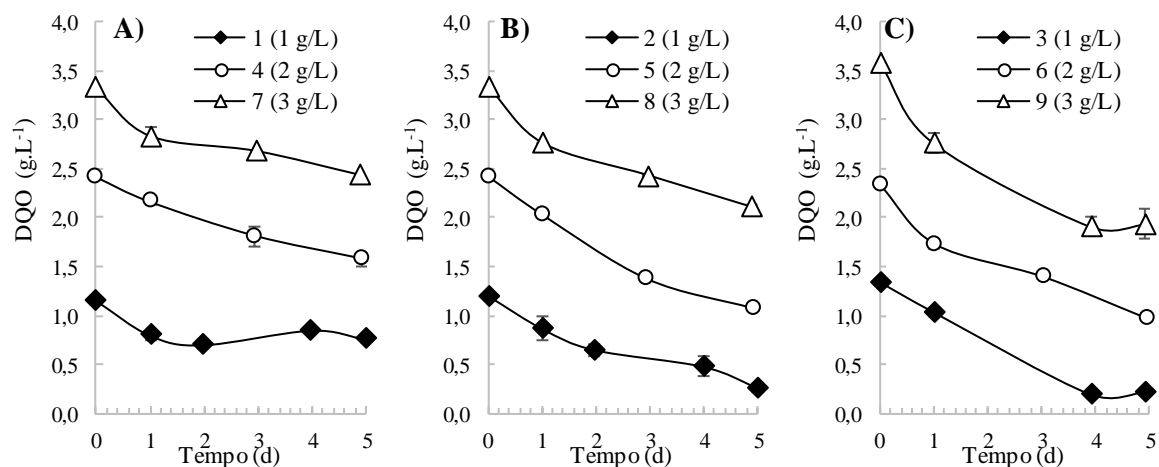


Uma característica evidente é que a concentração do co-substrato não afetou a resposta durante as horas iniciais do experimento. Em certo momento, porém, o doador de elétrons passou a ser limitante nos ensaios com menor nível de fonte de carbono. Dai et al. (2018) observaram que a concentração de glicose limitou a descoloração reductiva de um corante azo nas concentrações de até 1 g.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em ambiente anaeróbio e utilizando meio basal livre de sulfato e com concentração variável de Acid Orange 7 (200-1000 mg.L<sup>-1</sup>). Resultados similares foram obtidos por outros autores, inclusive para concentrações do composto azo similares à deste estudo (Tan et al., 2016, 2013; Yang et al., 2009).

Isto ocorre porque a redução do cromóforo é mediada por cofatores enzimáticos produzidos na metabolização desse co-substrato, i.e. cofatores reduzidos como o NADH e NADPH agem transferindo elétrons provenientes do substrato ao corante azo (Imran et al., 2016). Observa-se, também, que a interrupção do mecanismo de remoção de cor ocorre em períodos mais breves quanto menor é a concentração de glicose e maior o nível de aeração intermitente. Os efeitos da aeração serão discutidos em detalhe no tópico seguinte.

Em relação à remoção de DQO, não há um padrão evidente que permita relacionar a concentração inicial de glicose à evolução deste parâmetro nos ensaios (**Figura 5.3**). Observa-se que a biodegradação da matéria orgânica ocorreu a ritmo constante, na maioria dos casos, mas foi pouco expressiva nos ensaios com 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Os testes estatísticos, abordados na seção 5.2.3, poderão indicar com maior clareza se os efeitos da concentração do co-substrato são significativos para esta resposta.

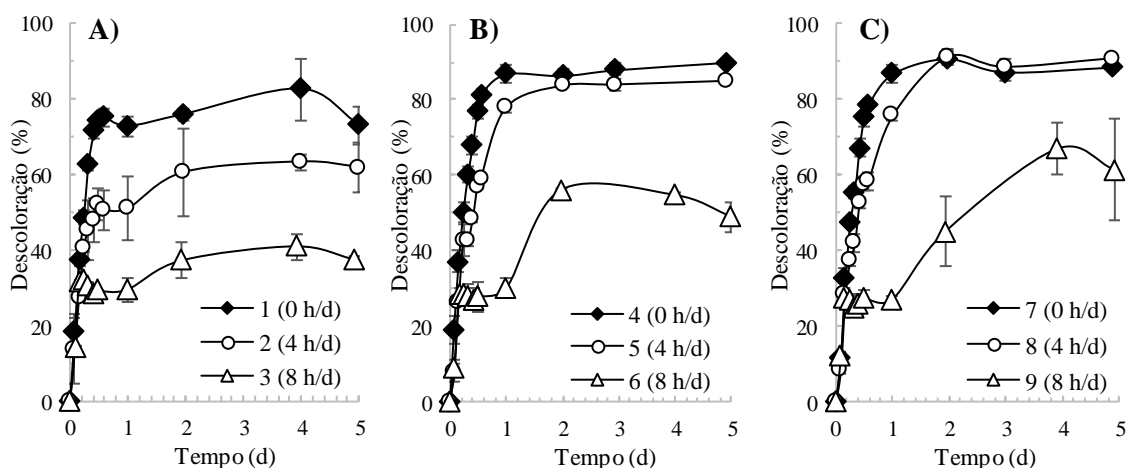
**Figura 5.3.** Efeitos da concentração inicial de glicose na evolução da demanda química de oxigênio (DQO) média ao longo do tempo. Condições de aeração intermitente: A) 0 h.d<sup>-1</sup>; B) 4 h.d<sup>-1</sup>; e C) 8 h.d<sup>-1</sup>.



### 5.1.2. Efeitos da aeração intermitente

A **Figura 5.4** apresenta os mesmos resultados de descoloração média do DB22 ao longo do tempo, porém organizados de forma a enfatizar os efeitos da aeração intermitente. As estratégias testadas foram de 0, 4 e 8 ciclos diários de aeração, com duração de 1 hora cada, para cada concentração do co-substrato.

**Figura 5.4.** Efeitos da aeração intermitente na remoção de cor média ao longo do tempo. Concentração inicial de glicose: A) 1 g.L<sup>-1</sup>; B) 2 g.L<sup>-1</sup>; e C) 3 g.L<sup>-1</sup>.



Observa-se que a eficiência de remoção de cor decresce com o aumento da frequência de aeração. Para a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose, o nível intermediário de aeração foi suficiente para causar o decréscimo significativo no desempenho dos reatores biológicos (**Fig. 5.4-A**). Por outro lado, a ocorrência foi pouco expressiva para as concentrações de 2 e 3 g.L<sup>-1</sup>

de glicose, em que a eficiência de descoloração foi prejudicada somente para níveis mais elevados de aeração intermitente, i.e. 8 h.d<sup>-1</sup> (Fig. 5.4-B e 5.4-C).

Como discutido no tópico anterior, os elétrons removidos do substrato orgânico são utilizados para reduzir o NAD<sup>+</sup> a NADH, sendo que esta coenzima pode intermediar diversas reações de óxido-redução. Na presença de oxigênio dissolvido, o NADH será utilizado preferencialmente para a respiração aeróbia devido ao elevado potencial de redução ( $E_0'$ ) do par redox O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (Madigan et al., 2014). Alternativamente, os cofatores enzimáticos podem ser utilizados para reduzir o corante azo, fato que ocorre somente nas fases anóxicas ou anaeróbias porque o composto azo é um acceptor de elétrons menos eficiente (Dos Santos et al., 2007). A inibição competitiva causada pelo oxigênio explica porque, no cálculo dos valores de K, o modelo de pseudo-primeira ordem se ajustou melhor aos dados obtidos nos ensaios sem aeração intermitente ou com maiores concentrações de glicose (Tabela 5.2). Nestes casos, em que o doador de elétrons não é limitante, a reação depende quase exclusivamente da concentração do corante no meio reacional, aproximando-se de uma cinética de primeira ordem. Estes resultados sugerem que o aumento do nível de aeração intermitente pode ser compensado por um incremento da concentração inicial de co-substrato na AR, impedindo, deste modo, a inibição do mecanismo de descoloração redutiva pela respiração aeróbia.

**Tabela 5.2.** Parâmetros do ajuste de um modelo de primeira ordem aos dados de descoloração do DB22 ao longo do tempo.

Ensaio	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Aeração (h.d <sup>-1</sup> )	K (d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	K (d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
E-01	1	0	1,56	0,70	1,34	0,67
E-02	1	4	0,51	0,67	0,27	0,48
E-03	1	8	0,05	0,36	0,06	0,43
E-04	2	0	2,29	0,93	2,06	0,91
E-05	2	4	1,46	0,98	1,54	0,97
E-06	2	8	0,23	0,81	0,24	0,80
E-07	3	0	2,28	0,97	2,08	0,91
E-08	3	4	1,15	0,97	1,30	0,99
E-09	3	8	0,28	0,94	0,20	0,89

O maior valor médio de K encontrado foi de 2,18 d<sup>-1</sup>, observado nos ensaios não-aerados com concentrações de co-substrato de 2 e 3 g.L<sup>-1</sup> (E-04 e E-07, respectivamente). Estes valores são superiores àqueles divulgados em um estudo envolvendo a descoloração redutiva do corante azo Reactive Red 2 por um lodo granular anaeróbio termofílico, em que a maior taxa de

descoloração ( $K=1,52 \text{ d}^{-1}$ ) foi obtida a  $55^\circ\text{C}$  na presença do mediador redox antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS). Em condição mesofílica e ausência de mediador redox, o valor de  $K$  encontrado pelos autores foi de  $0,15 \text{ d}^{-1}$  (Van Der Zee et al., 2003). Os resultados apontam para uma vantagem na utilização de consórcios microbianos fermentativos com adaptação prévia ao azo. Na presença da aeração intermitente, a maior velocidade média de descoloração foi obtida nas condições de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e tempo de aeração de  $4 \text{ h.d}^{-1}$  ( $K = 1,50$ ).

Outro aspecto notável do processo é que, sobretudo nos ensaios com  $8 \text{ h.d}^{-1}$  de aeração, a descoloração decresceu a partir do quarto dia. Os resultados sugerem que houve formação de subprodutos da degradação do corante que absorvem luz nos comprimentos de onda do espectro visível. Ainda, Isik e Sponza (2004) constataram que as aminas aromáticas podem sofrer auto-oxidação na presença de oxigênio, resultando na formação de novos compostos azo que conferem cor à AR. Este fato se torna ainda mais explícito nos casos de ensaios inteiramente anóxicos (i.e. não sujeitos à aeração descontínua) cujo efluente é submetido à centrifugação (**Figura 5.5**).

**Figura 5.5.** Aspecto visual de efluente tratado nas condições de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  glicose e ausência de ciclos de aeração. À esquerda, efluente ao final do tratamento; e, à direita, o mesmo efluente após centrifugação ( $5 \text{ min} \times 9000 \text{ rpm}$ ).

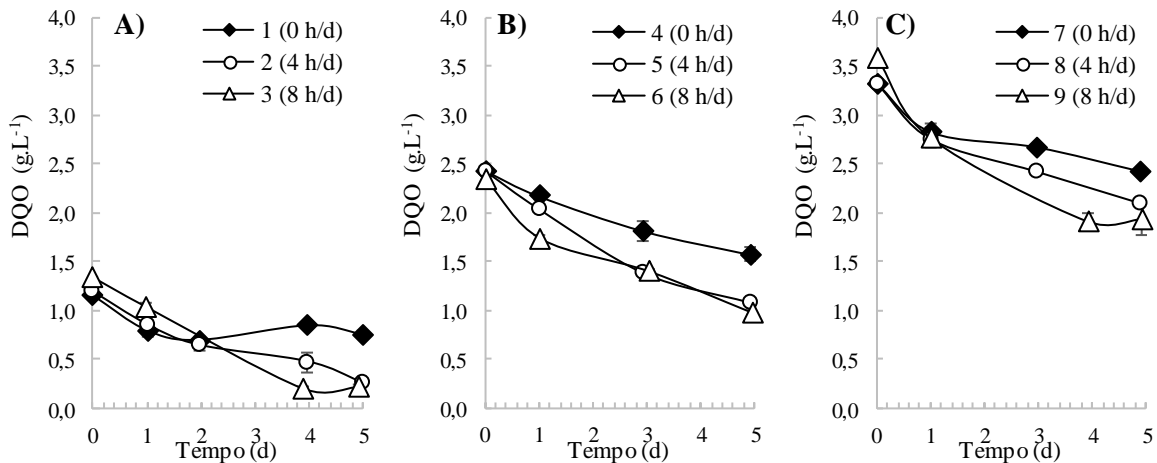


A DQO residual também foi monitorada ao longo do tempo nos experimentos. A **Figura 5.6** mostra a evolução do parâmetro em diferentes estratégias de aeração. Nos ensaios sem aeração, observou-se baixo desempenho de remoção de matéria orgânica, a despeito das elevadas eficiências de degradação do composto azo. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo de Dafale et al. (2010), em que se obteve remoção média de DQO de 35% no compartimento anóxico de um sistema de reatores anóxico-aeróbio. O fato pode ser atribuído à



ausência de comunidades microbianas que atuam, em sintrofismo, na conversão do substrato orgânico em metano (Stams e Plugge, 2009). Nos demais casos, a presença de acceptor exógeno de elétrons possibilitou a oxidação microbiana de parte da matéria orgânica a CO<sub>2</sub> pelo metabolismo aeróbio, resultando em maior remoção de DQO nessas condições.

**Figura 5.6.** Efeitos da aeração intermitente na evolução da demanda química de oxigênio (DQO) média ao longo do tempo. Concentração inicial de glicose: A) 1 g.L<sup>-1</sup>; B) 2 g.L<sup>-1</sup>; e C) 3 g.L<sup>-1</sup>.



A tendência de estabilização nos valores de DQO residual era esperada nos ensaios não aerados devido ao acúmulo de ácidos orgânicos. Entretanto, a ocorrência deste fenômeno nos experimentos aerados – principalmente naqueles com tempo de aeração de 8 h.d<sup>-1</sup> – pode ser explicada com o auxílio da **Figura D.1** e **Figura D.2** (Apêndice D). Observa-se que o pH da AR aumenta após cada ciclo de aeração, o que possivelmente está relacionado ao *stripping*<sup>9</sup> do CO<sub>2</sub> pela introdução de ar no meio reacional. Este aumento no pH é rapidamente compensado pelo consumo de alcalinidade durante as 24 h iniciais do experimento porque coincide com o período de crescimento exponencial da comunidade microbiana. Nos dias seguintes, observa-se que o pH tende a aumentar, estabilizando na faixa de pH de 8 a 9 nos experimentos sujeitos à aeração intermitente. Nesta fase, o consumo de alcalinidade é menor porque a comunidade microbiana já atingira a fase estacionária. A elevada basicidade do meio nas horas finais do experimento coincide com a estabilização nos valores de DQO residual, sugerindo que ocorre inibição dos microrganismos pelo pH.

<sup>9</sup> Termo em inglês utilizado para referir-se à remoção de um componente do meio líquido pela introdução de uma corrente de gás.

## 5.2. Modelo empírico e superfície de resposta

Os dados do experimento fatorial, discutidos na seção anterior, foram utilizados para a construção de um modelo empírico para cada uma das respostas investigadas. A concentração de glicose ( $X_1$ ) e aeração intermitente ( $X_2$ ) foram tratadas como variáveis contínuas representadas pelos códigos -1, 0 e 1 para os fins de cálculo. Os resultados são demonstrados a seguir.

### 5.2.1. Descoloração

A remoção de cor ou descoloração é parâmetro indicativo da quebra da ligação azo, que é a primeira etapa envolvida na degradação de corantes da classe. O modelo empírico que descreve a descoloração deste efluente em função da concentração inicial de glicose e da aeração intermitente, nas condições do estudo, é descrito na **Eq. 5.1**:

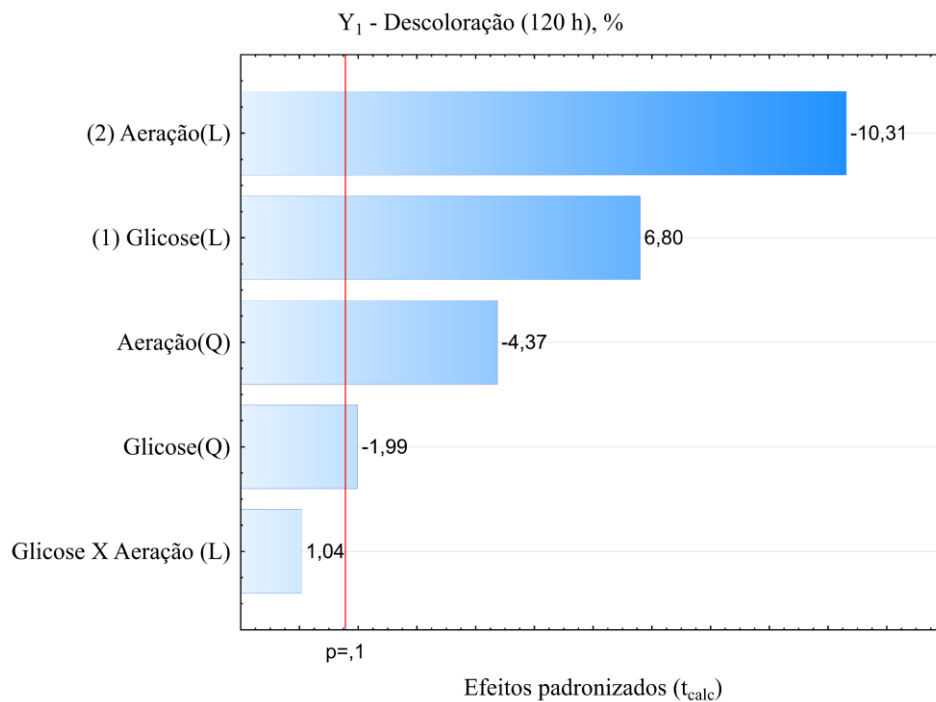
$$Y_1 = 83,100 + 11,392 X_1 - 5,775 X_1^2 - 17,275 X_2 - 12,675 X_2^2 \quad (5.1)$$

Ambos os efeitos lineares e quadráticos dos fatores  $X_1$  e  $X_2$  foram considerados significativos na ANOVA dos coeficientes da regressão ( $p < 0,1$ ), embora a hipótese de nulidade tenha sido aceita para a interação entre as variáveis (**Tabela 5.3**). No gráfico de Pareto, demonstrado na **Figura 5.7**, observa-se que os efeitos lineares da aeração intermitente e da concentração inicial de glicose são, nessa ordem, os mais importantes. Na ANOVA dos fatores (**Tabela C.1** do Apêndice C), fica evidente que a aeração intermitente é o parâmetro que mais influencia a descoloração ( $F_{\text{calc}}=62,4$ ), embora ambos os fatores tenham sido altamente significativos ( $p\text{-valores} < 0,0001$ ).

**Tabela 5.3.** ANOVA dos coeficientes de regressão para a resposta descoloração ( $Y_1$ ) após 120 h de experimento. Nível de significância de 10%.

Fatores	Coefficientes da regressão	Erro padrão	$t_{\text{calc}}$	p-valor
Média	83,100	3,058	27,18	<0,0001
$X_1$	11,392	1,675	6,80	<0,0001
$X_1^2$	-5,775	2,901	-1,99	0,0698
$X_2$	-17,275	1,675	-10,31	<0,0001
$X_2^2$	-12,675	2,901	-4,37	0,0009
$X_1 \cdot X_2$	2,125	2,051	1,04	0,3206

**Figura 5.7.** Diagrama de Pareto dos coeficientes de regressão para a variável descoloração (120 h). Nível de significância de 10%.



A aeração intermitente interferiu de forma negativa na remoção de cor porque, em condições aeróbias, o oxigênio é o aceptor preferencial de elétrons (Santos, 2001; Singh et al., 2015). Isto ocorre porque, segundo Chung e Stevens (1993), a redução do azo por cofatores enzimáticos é um processo menos eficiente energeticamente, como foi discutido na seção 5.1.2. Resultados similares foram obtidos no estudo de Chang et al. (2001), que observou que a descoloração de um corante azo mediada por azoredutases não ocorreu até que a concentração de oxigênio dissolvido no meio decresceu para valores próximos a zero. Os resultados sugerem que a descoloração ocorreu nas fases anaeróbias, tendo os reatores se comportado como reatores acidogênicos durante esse período. Este fato contesta a hipótese de que os microrganismos aeróbios poderiam contribuir diretamente no mecanismo de remoção de cor.

A concentração inicial de glicose, por outro lado, afetou positivamente a resposta. Isto se deve, possivelmente, à maior disponibilidade de doadores de elétrons para a redução do cromóforo (Seção 5.1.1). Ademais, como será visto na Seção 5.5.2, a diversidade de populações de bactérias foi menor nos ensaios com menor concentração de glicose (1 g.L<sup>-1</sup>). Como o processo de descoloração reductiva é dependente da interação sinérgica entre enzimas produzidas por diferentes populações microbianas (Kurade et al., 2017; Phugare et al., 2011), estes ensaios foram responsáveis pelas menores eficiências de descoloração.

No teste de qualidade de ajuste do modelo quadrático, a regressão foi considerada estatisticamente significativa, com p-valor  $< 0,0001$  (**Tabela 5.4**). O valor de  $F_{\text{calc}}$  foi de  $43,7^{10}$ , muito superior ao valor tabelado de 2,43 (no nível de 90%). De acordo com Box e Wetz (1973), um modelo é considerado altamente preditivo quando o valor de  $F_{\text{calc}}$  é superior a dez vezes o valor de  $F_{\text{tab}}$ , o que ocorre nesta ocasião. O modelo se ajustou bem aos dados experimentais, visto que a razão entre o quadrado médio devido à falta de ajuste e o quadrado médio devido ao erro puro foi de 1,5, menor que o valor tabelado de 2,69. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,93, o que significa que o modelo quadrático explica 93% da variação total, valor bastante próximo à percentagem máxima de variação explicável ( $95,8\%$ )<sup>11</sup>. Ainda, o gráfico dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo reforça visualmente que não há evidência de falta de ajuste, visto que o erro tem distribuição aleatória (**Figura C.2** do Apêndice C).

**Tabela 5.4.** ANOVA para o ajuste de um modelo quadrático às respostas de descoloração ( $Y_1$ ) obtidas após 120 h de experimento. Nível de significância de 10%.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	$F_{\text{calc}}$	p-valor
Regressão	5914,4	4	1478,6	43,7	$<0,0001$
Resíduos	440,0	13	33,8		
Falta de Ajuste	172,7	4	43,2	1,5	0,2937
Erro Puro	267,3	9	29,7		
Total	6354,4	17			

SQ = soma quadrática; QM = quadrado médio; GL = graus de liberdade.

A **Figura 5.8** ilustra a superfície de resposta para a variável dependente  $Y_1$  (descoloração em 120 h) gerada a partir do modelo empírico descrito na **Eq. 5.1**. A resposta aumenta linearmente com o aumento de  $X_1$  (concentração de glicose) que, como visto anteriormente, tem a segunda maior contribuição no modelo estatístico. Todos os outros efeitos considerados são negativos, incluindo o efeito quadrático de  $X_1$ . Esta particularidade implica em uma superfície de resposta cumeeira com região ótima situada na faixa de 2,8 a 3,0  $\text{g.L}^{-1}$ , para glicose, e aeração intermitente de 0 a 2  $\text{h.d}^{-1}$ . Embora não seja possível visualizar o comportamento de  $Y_1$  em concentrações maiores do co-substrato ( $>3 \text{ g.L}^{-1}$ ), é pouco provável-

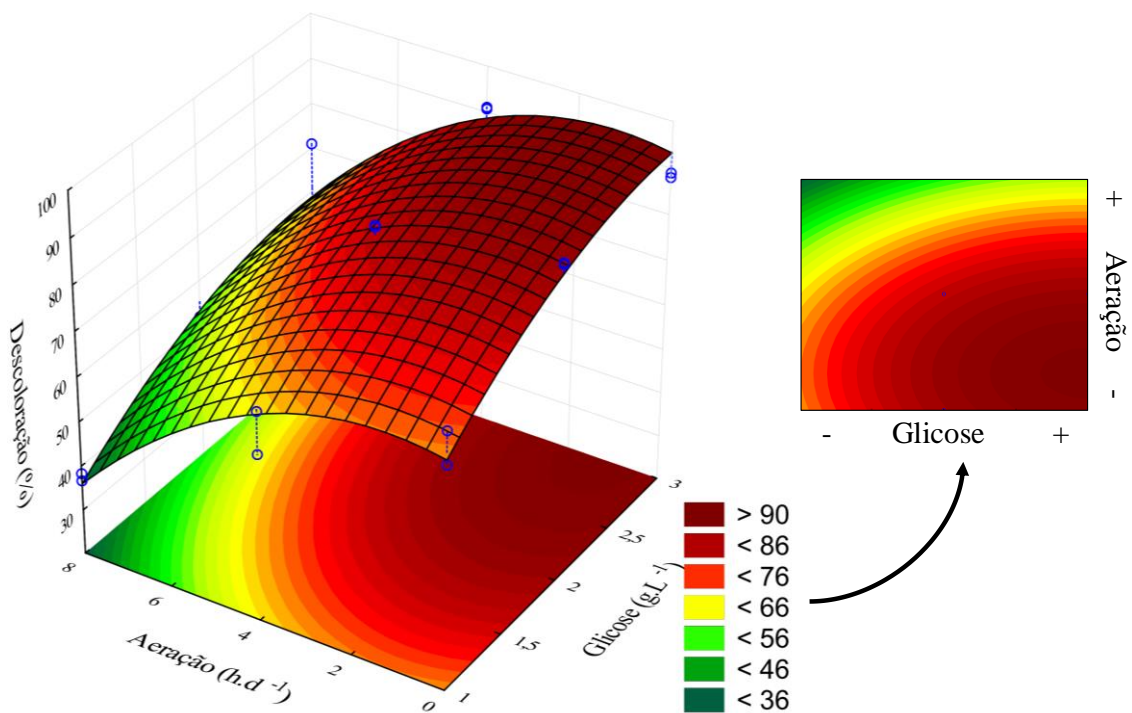
<sup>10</sup> O valor de  $F_{\text{calc}}$  da regressão mede a razão entre o QM da regressão e o QM do resíduo (Neto et al., 2010).

<sup>11</sup> A percentagem de variação explicada ( $R^2$ ) é calculada pela razão entre a SQ da regressão e a SQ total. Entretanto, o valor de referência não é de 100% devido à contribuição do erro puro, que deve ser subtraída do valor de SQ total no cálculo da percentagem máxima de variação explicável (Neto et al., 2010).

**Tabela 5.5.** Respostas previstas e observadas para a variável dependente descoloração final (120 h) obtidas em cada condição do experimento fatorial.

Ensaio	X <sub>1</sub> - Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> - Aeração (h.d <sup>-1</sup> )	Y <sub>1</sub> - Descoloração (%)	
			Observado	Predito
1	1	0	76,7	70,5
2	1	4	66,5	65,9
3	1	8	36,7	36,0
4	2	0	90,1	87,7
5	2	4	84,8	83,1
6	2	8	46,2	53,2
7	3	0	89,0	93,3
8	3	4	90,7	88,7
9	3	8	70,9	58,8
10	1	0	69,5	70,5
11	1	4	57,2	65,9
12	1	8	38,3	36,0
13	2	0	89,8	87,7
14	2	4	85,2	83,1
15	2	8	51,8	53,2
16	3	0	88,0	93,3
17	3	4	91,1	88,7
18	3	8	51,9	58,8

**Figura 5.8.** Superfície de resposta para a variável dependente descoloração (120 h) em função da concentração inicial de glicose e aeração intermitente.



que eficiências muito superiores a 93% sejam atingidas, já que os metabólitos do corante e outros compostos presentes no meio também podem conferir cor à AR após a completa degradação do cromóforo azo. Em relação a  $X_2$  tem-se que, no longo prazo (120 h), valores de aeração intermitente de até  $2 \text{ h.d}^{-1}$  têm impactos similares sobre a remoção de cor final em relação à ausência de aeração. Estes resultados sugerem que, em um contexto onde baixos níveis de aeração intermitente sejam suficientes à biodegradação dos subprodutos da redução do azo, a estratégia pode ser aplicada com a finalidade de se obter melhores eficiências no processo de tratamento de efluentes industriais contendo azo-corantes.

### 5.2.2. Constante de descoloração

A constante ou velocidade de descoloração (K) mede o decaimento da cor no reator biológico em função do tempo. Este parâmetro é importante porque está estritamente relacionado aos custos de construção e operação das unidades de tratamento. O modelo empírico que relaciona  $X_1$  e  $X_2$  aos valores de K, no intervalo estudado, é demonstrado na Eq. 5.2:

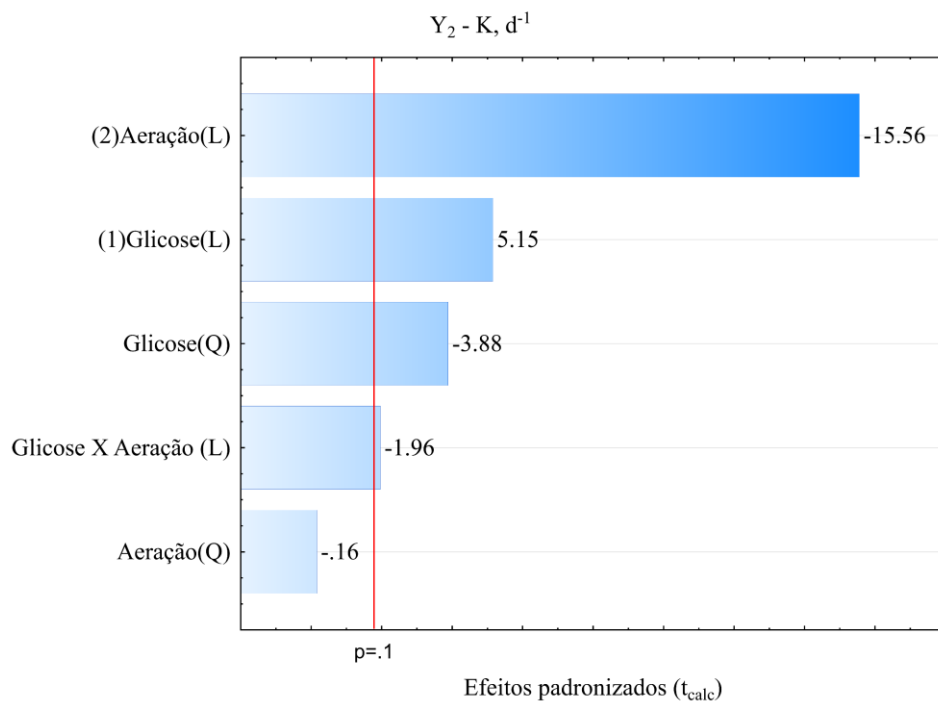
$$Y_2 = 1,303 + 0,292 X_1 - 0,380 X_1^2 - 0,879 X_2 - 0,136 X_1 X_2 \quad (5.2)$$

Os efeitos linear e quadrático da concentração de glicose e efeito linear da aeração intermitente foram considerados importantes na ANOVA dos coeficientes. Além disso, a interação entre os fatores foi estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ) (Tabela 5.6). O gráfico de Pareto da Figura 5.9 demonstra os efeitos padronizados de cada fator estudado, onde constata-se que a componente linear da aeração intermitente é a mais relevante na previsão da constante de descoloração.

**Tabela 5.6.** ANOVA dos coeficientes de regressão para a resposta constante de descoloração ( $Y_2$ ). Nível de significância de 10%.

Fatores	Coefficientes da regressão	Erro padrão	$t_{\text{calc}}$	p-valor
Média	1,292	0,103	12,56	<0,0001
$X_1$	0,292	0,056	5,18	0,0002
$X_1^2$	-0,380	0,098	-3,89	0,0021
$X_2$	-0,879	0,056	-15,61	<0,0001
$X_2^2$	0,018	0,098	0,18	0,8607
$X_1 \cdot X_2$	-0,136	0,069	-1,97	0,0718

**Figura 5.9.** Diagrama de Pareto dos coeficientes de regressão para a variável constante de descoloração. Nível de significância de 10%.



Na ANOVA dos fatores (**Tabela C.2** do Apêndice C), a contribuição da aeração intermitente fica ainda mais evidente. O valor de  $F_{\text{calc}}$  da variável é de 261,6, ante o valor de 22,5 de  $F_{\text{calc}}$  da concentração de glicose. Comparando-se aos valores da **Tabela C.1**, tem-se que os efeitos adversos da aeração intermitente são mais importantes para a constante de descoloração do que na previsão de valores de remoção de cor final.

As variáveis  $X_1$  e  $X_2$  têm efeitos sinérgicos sobre a resposta  $Y_2$ , o que não foi observado no modelo utilizado para prever a descoloração ao final dos experimentos. A interação entre os efeitos da concentração do co-substrato e da aeração intermitente, em relação a essa resposta, pode ser explicada resgatando-se os preceitos das seções 5.1.1 e 5.1.2. O substrato é utilizado como fonte de equivalentes de redução para a degradação do cromóforo azo. Concomitantemente, a transferência desses elétrons ao corante é dependente da ausência de oxigênio. Assim, tem-se que a velocidade de descoloração depende da concentração de doadores de elétrons e da frequência de aeração, simultaneamente. Este efeito sinérgico não é notado no longo prazo, i.e. na investigação da descoloração ao fim dos experimentos ( $Y_1$ ), porque só é importante para a velocidade com que o processo ocorre. A interação entre  $X_1$  e  $X_2$  afeta negativamente a resposta porque os efeitos adversos da aeração são mais significativos que os efeitos positivos da concentração de glicose.

O modelo explica 96% da variação total, ante uma percentagem de variação explicável de 99%. A regressão foi considerada estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ), novamente com valores de  $F_{\text{calc}}$  muito acima do valor tabelado, indicando que o modelo é altamente preditivo (**Tabela 5.7**).

**Tabela 5.7.** ANOVA para o ajuste de um modelo quadrático às respostas de constante de descoloração ( $Y_2$ ). Nível de significância de 10%.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	$F_{\text{calc}}$	p-valor
Regressão	11,0	4	2,8	78,2	<0,0001
Resíduos	0,5	13	0,0		
Falta de Ajuste	0,3	4	0,1	6,5	0,0094
Erro Puro	0,1	9	0,0		
Total	11,5	17			

SQ = soma quadrática; QM = quadrado médio; GL = graus de liberdade.

Os parâmetros até então analisados não indicam nenhuma evidência de falta de ajuste. O valor de  $R^2$  é suficientemente elevado e o quadrado médio dos resíduos tende a zero. Entretanto, o valor calculado de F para a falta de ajuste é ligeiramente superior ao valor obtido na tabela de distribuição de F a 10% ( $F_{\text{calc}} = 6,5 > 2,69$ ). Os gráficos de valores preditos versus observados e de resíduos demonstram que o modelo tem menor ajuste aos níveis mais baixos da resposta, embora fora dessa faixa a previsão possa ser considerada adequada (**Figura C.3** e **Figura C.4** do Apêndice C).

De acordo com Rodrigues e Lemma (2014), existem casos onde a regra do teste de F não é satisfeita por uma questão matemática, em que o quadrado médio do erro puro tende ao valor zero. Isto é compreensível, visto que o valor de F, neste caso, representa a razão  $QM_{\text{falta de ajuste}}/QM_{\text{erro puro}}$ . Neste estudo, deparou-se com esta situação, visto que  $QM_{\text{erro puro}}$  tem valor de 0,01. Além disso, poder-se-ia ajustar aos dados experimentais um modelo de grau superior a 2, com a análise de interações quadráticas entre os fatores, na busca de se obter um ajuste excelente. Todavia, modelos mais complexos são pouco práticos e têm seu emprego, muitas vezes, injustificável (Neto et al., 2010). Diante dos fatos supracitados, considerar-se-á que o modelo quadrático com interações de primeira ordem é suficiente para prever os valores de constante de descoloração.

A **Tabela 5.8** contém valores de comparação entre as respostas previstas e observadas para a constante de descoloração. Para valores de K próximos a zero, como ocorre na condição de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  glicose e  $8 \text{ h.d}^{-1}$  aeração, o modelo prevê respostas negativas, o que é consequência do menor ajuste aos níveis mais baixos da resposta. Na superfície da **Figura 5.10**, observa-se

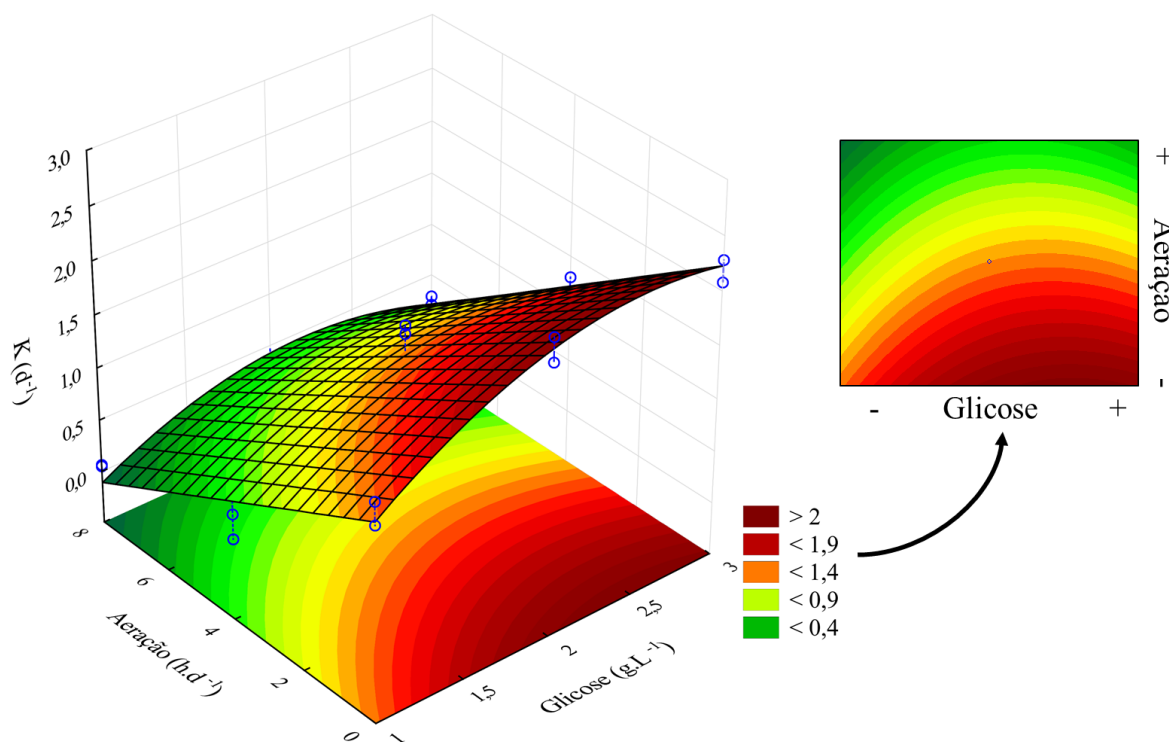


que a velocidade de descoloração aumenta linearmente com o aumento da concentração de glicose, até  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , e decresce, também de forma constante, com o aumento dos ciclos de aeração. A componente quadrática de  $X_1$ , de sinal negativo, confere uma ligeira curvatura na superfície que limita o aumento de  $K$  para níveis mais altos do co-substrato. Embora a velocidade de descoloração aumente com o aumento da disponibilidade de equivalentes de redução no meio, a partir de certo nível, a constante é limitada por outros fatores, a saber: atividade das enzimas envolvidas na descoloração; transferência de massas do composto azo através da membrana celular; e capacidade de regeneração de cofatores enzimáticos que atuam como doadores de elétrons à molécula de azo, e.g. NADH, NADPH e riboflavina (Chang et al., 2001; Imran et al., 2016). Observa-se, ainda, que os maiores valores de  $K$  são obtidos na ausência de aeração intermitente ( $0 \text{ h.d}^{-1}$ ), enquanto a descoloração de longo prazo não é afetada para níveis de  $X_2$  de até  $2 \text{ h.d}^{-1}$ . Esta informação é relevante porque, na prática, traduz-se na necessidade de maiores tempos de detenção hidráulica em biorreatores submetidos à aeração intermitente para que se possa alcançar eficiências similares àsquelas dos reatores fermentativos.

**Tabela 5.8.** Respostas previstas e observadas para a variável dependente constante de descoloração obtidas em cada condição do experimento fatorial.

Ensaio	$X_1$ - Glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$X_2$ - Aeração ( $\text{h.d}^{-1}$ )	$Y_2$ - $K$ ( $\text{d}^{-1}$ )	
			Observado	Predito
1	1	0	1,56	1,38
2	1	4	0,51	0,63
3	1	8	0,05	-0,11
4	2	0	2,29	2,18
5	2	4	1,46	1,30
6	2	8	0,23	0,43
7	3	0	2,28	2,23
8	3	4	1,15	1,21
9	3	8	0,28	0,20
10	1	0	1,34	1,38
11	1	4	0,27	0,63
12	1	8	0,06	-0,11
13	2	0	2,06	2,18
14	2	4	1,54	1,30
15	2	8	0,24	0,43
16	3	0	2,08	2,23
17	3	4	1,30	1,21
18	3	8	0,20	0,20

**Figura 5.10.** Superfície de resposta para a variável constante de descoloração em função da concentração inicial de glicose e aeração intermitente.



### 5.2.3. Remoção de DQO

A remoção de DQO ( $Y_3$ ) tem grande importância porque, embora o substrato orgânico seja utilizado como fonte de carbono e de elétrons aos processos biológicos aqui estudados, a presença de matéria orgânica nos corpos hídricos pode causar uma série de desequilíbrios ambientais. O modelo empírico que descreve a variável em função de  $X_1$  e  $X_2$  é descrito a seguir:

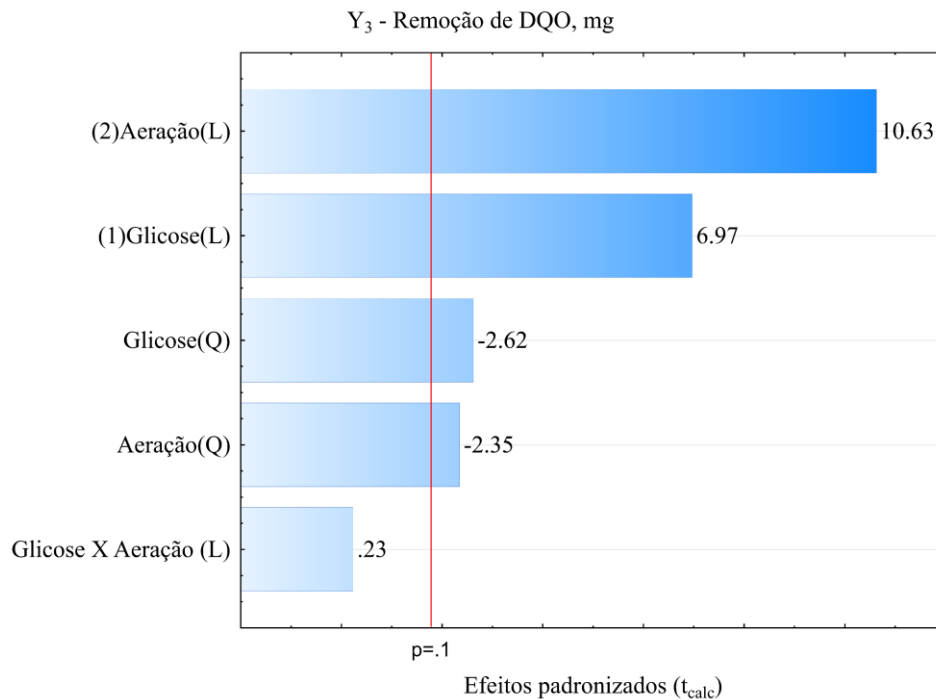
$$Y_3 = 632,322 + 107,767 X_1 - 70,233 X_1^2 + 164,342 X_2 - 62,908 X_2^2 \quad (5.3)$$

A ANOVA dos coeficientes, demonstrada na **Tabela 5.9**, mostra que os efeitos lineares e quadráticos da concentração de glicose e aeração intermitente foram estatisticamente significativos ( $p < 0,1$ ). A interação entre os efeitos desses fatores, por outro lado, não afetou a resposta. O efeito linear de  $X_2$  foi o mais importante, seguido pelo efeito linear de  $X_1$ , como demonstrado pelo diagrama de Pareto da **Figura 5.11**.

**Tabela 5.9.** ANOVA dos coeficientes de regressão para a resposta remoção de DQO ( $Y_3$ ). Nível de significância de 10%.

Fatores	Coefficientes da regressão	Erro padrão	$t_{\text{calc}}$	p-valor
Média	632,322	28,226	22,40	<0,0001
$X_1$	107,767	15,460	6,97	<0,0001
$X_1^2$	-70,233	26,778	-2,62	0,0223
$X_2$	164,342	15,460	10,63	<0,0001
$X_2^2$	-62,908	26,778	-2,35	0,0368
$X_1 \cdot X_2$	4,412	18,935	0,23	0,8197

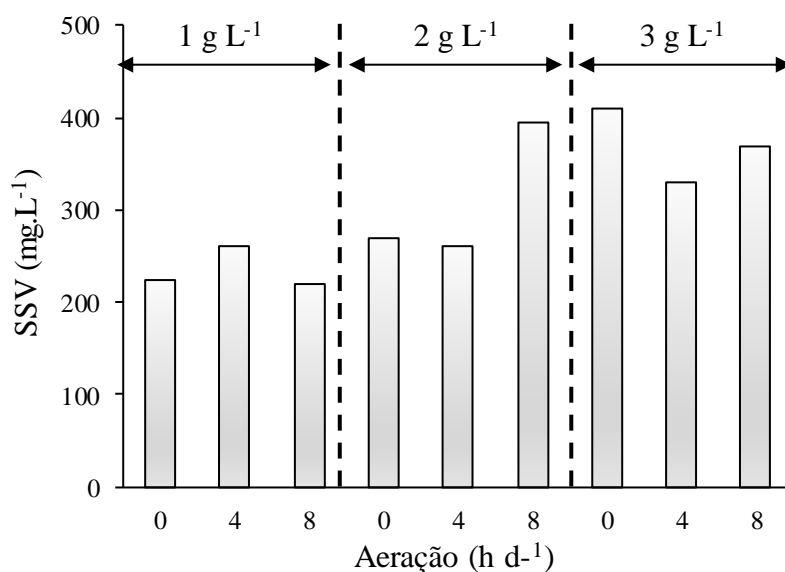
**Figura 5.11.** Diagrama de Pareto dos coeficientes de regressão para a variável constante de descoloração. Nível de significância de 10%.



A aeração intermitente foi a variável que mais influenciou a resposta, com valor de  $F_{\text{calc}}$  de 63,9 (Tabela C.3 do Apêndice C). Estes resultados são esperados, já que o metabolismo aeróbio é mais eficiente energeticamente. De acordo com Madigan et al. (2014, p.94), a oxidação completa de uma molécula de glicose a  $\text{CO}_2$ , pela via respiratória aeróbia, pode gerar 38 ATP, enquanto a fermentação alcóolica ou láctea, por exemplo, produz 2 ATP da mesma molécula. A relação existente entre o período de aeração e remoção de DQO já havia sido identificada claramente nos gráficos da Figura 5.6.

Os efeitos da concentração de glicose, menos visíveis pela análise da **Figura 5.3**, também se mostraram significativos na ANOVA dos fatores, a 90% de probabilidade. Pela equação de Monod, a velocidade de crescimento celular é proporcional à concentração inicial do substrato. Além disso, a concentração final de células depende da concentração inicial de substrato quando este é limitante (Levenspiel, 1998); de modo que há maior conversão da DQO solúvel em DQO particulada nos experimentos iniciados com maior concentração de glicose. A maior produção de SSV nos experimentos com 2 e 3 g L<sup>-1</sup> de glicose pode ser observada na **Figura 5.12**.

**Figura 5.12.** Concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) nos reatores de batelada após 120 h de tratamento biológico.



O coeficiente de determinação obtido foi de 93,5%, ante uma variação explicável de 98,4%. A regressão foi estatisticamente significativa no teste de ANOVA, com valor de  $F_{\text{calc}}$  de 46,9, indicando que o modelo é altamente preditivo. No gráfico de valores previstos versus observados, nota-se que o ajuste é menor para níveis maiores da resposta (**Figura C.5** do Apêndice C). Este fato se confirma mediante a análise do gráfico de resíduos deixados pelo modelo, em que os resíduos são maiores nestas ocasiões (**Figura C.6** do Apêndice C). Assim como determinado no tópico anterior, optar-se-á pelo uso do modelo quadrático com interações de primeira ordem para a previsão de  $Y_3$ , visto a complexidade e pouca praticidade dos modelos de ordem superior.

As respostas previstas e observadas para o parâmetro remoção de DQO são demonstradas na **Tabela 5.11**. A superfície de resposta é ilustrada na **Figura 5.13**. A remoção de DQO é maior quanto maiores os níveis de  $X_1$  e de  $X_2$ . Não é possível visualizar a região de cume da superfície em razão do intervalo de estudo. Maiores tempos de aeração implicariam na interrupção do me-

**Tabela 5.10.** ANOVA para o ajuste de um modelo quadrático às respostas de remoção de DQO ( $Y_3$ ). Nível de significância de 10%.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	$F_{calc}$	p-valor
Regressão	499022,8	4	124755,7	46,9	<0,0001
Resíduos	34573,8	13	2659,5		
Falta de Ajuste	25807,4	4	6451,8	6,6	0,0091
Erro Puro	8766,4	9	974,0		
Total	533596,6	17			

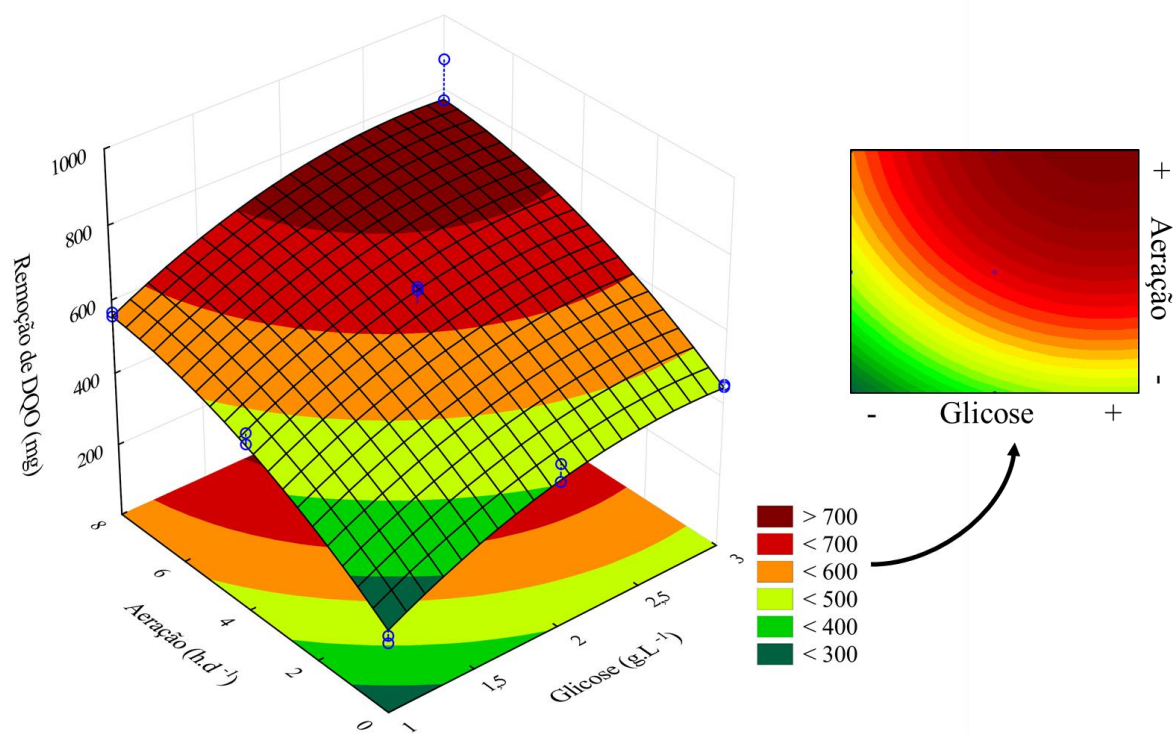
SQ = soma quadrática; QM = quadrado médio; GL = graus de liberdade.

canismo de descoloração, tendência já acusada nos testes com tempo de aeração de 8 h.d<sup>-1</sup>. Ao mesmo tempo, o estudo de concentrações superiores do co-substrato não refletiria as características normalmente encontradas em ARs têxteis. Em resumo, a aeração intermitente propicia uma maior eficiência de remoção de DQO, quando comparada ao processo estritamente anaeróbico, o que é desejável para efluentes com elevadas cargas de matéria orgânica.

**Tabela 5.11.** Respostas previstas e observadas para a variável dependente constante de descoloração obtidas em cada condição do experimento fatorial.

Ensaio	$X_1$ - Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	$X_2$ - Aeração (h.d <sup>-1</sup> )	$Y_3$ - Remoção de DQO (mg)	
			Observado	Predito
1	1	0	192	227
2	1	4	489	454
3	1	8	567	556
4	2	0	449	405
5	2	4	667	632
6	2	8	662	734
7	3	0	451	443
8	3	4	623	670
9	3	8	769	771
10	1	0	212	227
11	1	4	459	454
12	1	8	556	556
13	2	0	401	405
14	2	4	676	632
15	2	8	687	734
16	3	0	445	443
17	3	4	599	670
18	3	8	881	771

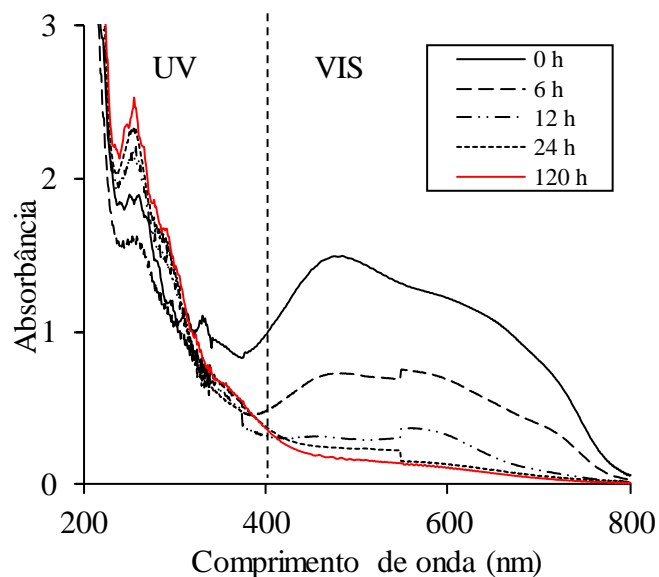
**Figura 5.13.** Superfície de resposta para a variável remoção de DQO como função da concentração inicial de glicose e aeração intermitente.



### 5.3. Biodegradação do DB22 e produção de metabólitos

A biodegradação do DB22 foi monitorada mediante análise das alterações no espectro de absorção UV-VIS da AR ao longo do tempo. A evolução temporal deste parâmetro em amostras de um ensaio modelo, identificado como E-07, é demonstrada na **Figura 5.14**.

**Figura 5.14.** Espectro UV-VIS de efluente durante a descoloração do DB22 em ensaio modelo. E-07: 3 g.L<sup>-1</sup> glicose; 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.

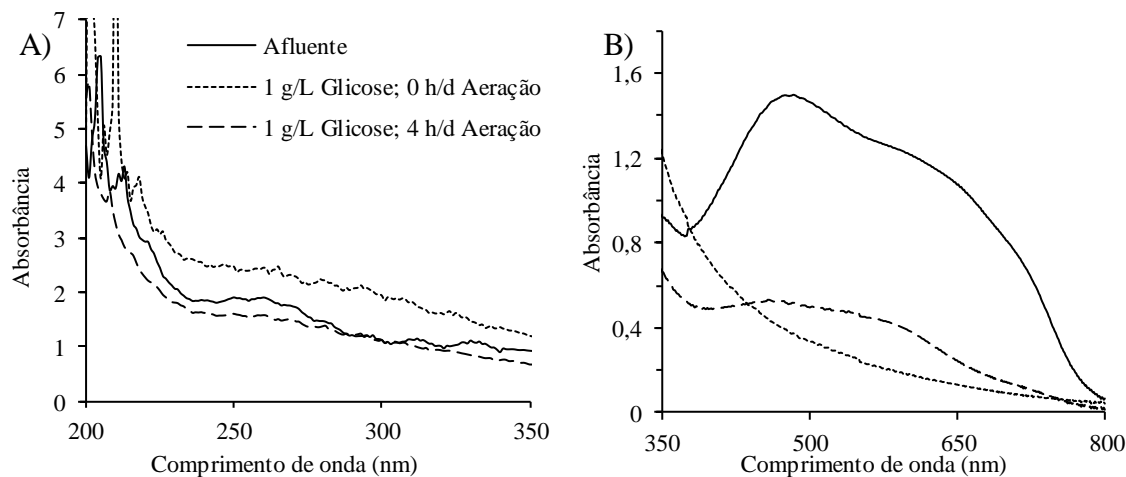


A princípio, o corante possuía picos de absorção no intervalo do espectro visível (483 nm) e na região do UV, estes últimos relacionados aos anéis de anilina, benzeno, naftaleno, entre outros, que compõe a molécula. Com o passar do tempo, o pico associado ao cromóforo foi gradualmente extinto. Por outro lado, em muitas das condições avaliadas, a descoloração ocorreu paralelamente ao aumento da absorbância em comprimentos de onda menores. Isto demonstra que, nestas condições, o cromóforo azo foi biodegradado e houve formação de metabólitos da descoloração.

Em relação às condições experimentais, diferentes padrões de mudança no espectro foram observados para níveis distintos dos fatores avaliados. Os perfis espectrais das amostras tratadas nas condições de 1 g.L<sup>-1</sup> de co-substrato e níveis de aeração intermitente de 0 e 4 h.d<sup>-1</sup> são apresentados na **Figura 5.15**. Na ausência de aeração, o desaparecimento do pico de 543 nm precedeu um aumento da área sob a curva de absorção no intervalo de 200-350 nm. Esta faixa está associada à presença de amins aromáticas, subprodutos comuns da descoloração reductiva de corantes azo (Pinheiro et al., 2004). Para o tempo de aeração de 4 h.d<sup>-1</sup>, a redução da área

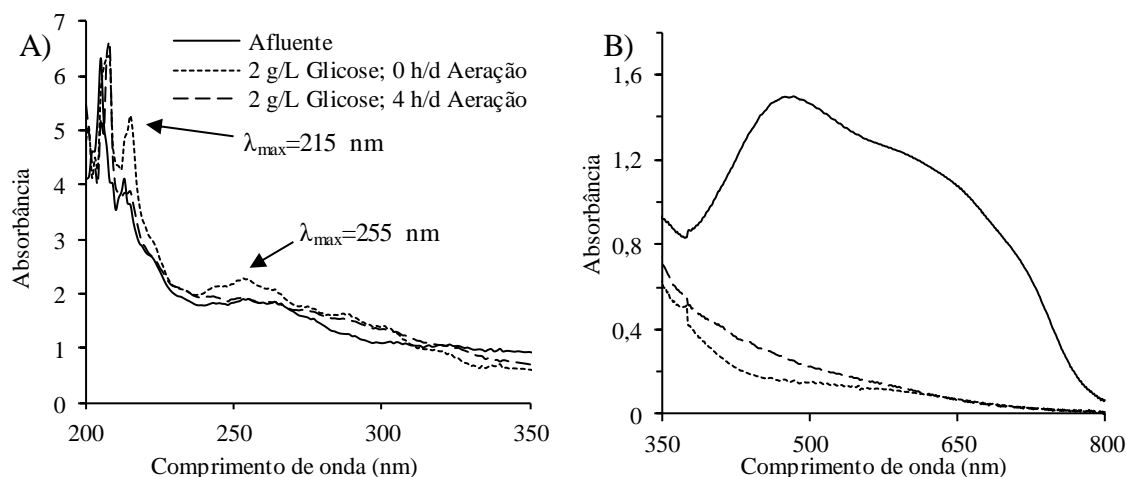
espectral associada à cor foi menor. Por outro lado, houve decréscimo da absorvância na região correspondente ao UV em relação à condição inicial ( $t=0$ ).

**Figura 5.15.** Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-01 e E-02. E-01: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.



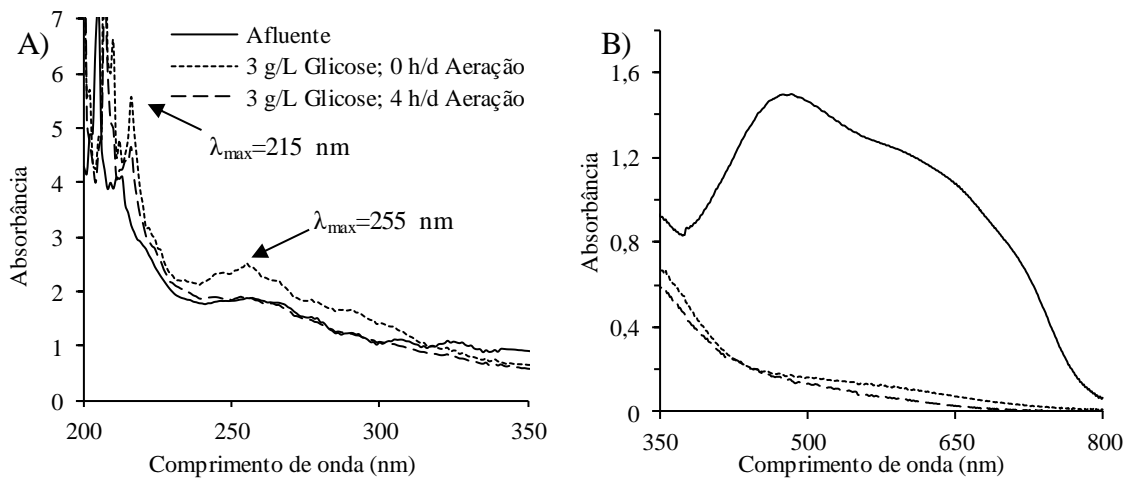
Para as concentrações de glicose de 2 e 3 g.L<sup>-1</sup> e ausência de aeração, ocorreu a formação de máximos nos comprimentos de onda de 215 e 255 nm, como apresentado nas **Fig. 16-A** e **17-A**. Para tempos de aeração de 4 h.d<sup>-1</sup>, no entanto, o perfil UV permaneceu constante em relação ao tempo inicial.

**Figura 5.16.** Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-04 e E-05. E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-05: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.





**Figura 5.17.** Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-07 e E-08. E-07: 3 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-08: 3 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.



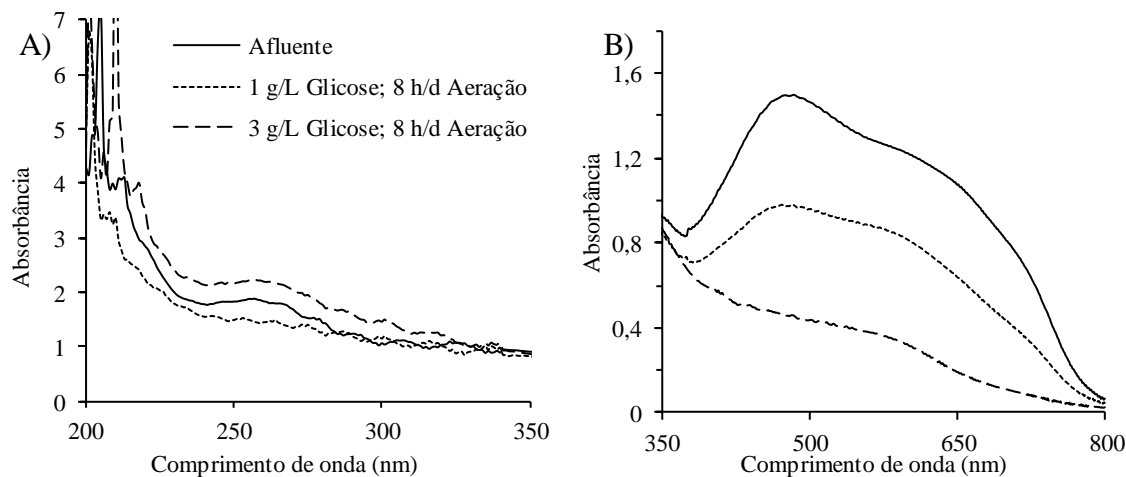
De acordo com Gavazza et al. (2015), a biodegradação do DB22 pode dar origem a aminas aromáticas como a anilina e ácido sulfanílico, a julgar pela estrutura da molécula. O ácido sulfanílico possui absorvância máxima nas regiões de 215 e 258-269 nm (Pinheiro et al., 2004). O seu respectivo sal de sódio tem  $\lambda_{max}$  de 247 nm, outrora detectado em estudo envolvendo a descoloração do Methyl Orange (Hsueh e Chen, 2007). Possivelmente, houve acúmulo de derivados da anilina, como o ácido sulfanílico, após a descoloração do DB22 nestas condições específicas. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Amaral et al. (2014) em estudo envolvendo o tratamento biológico de AR têxtil contendo o DB22 em sistema de fluxo contínuo. Na ocasião, o efluente do reator UASB apresentou picos na faixa de 230-260 nm.

Nos casos supracitados, observa-se que há menor acúmulo de metabólitos detectáveis no UV quando a aeração intermitente é utilizada no nível de 4 h.d<sup>-1</sup>. Este fato pode ser atribuído à degradação aeróbia dos compostos aromáticos gerados na etapa de descoloração, que ocorreu intercaladamente nos experimentos com aeração intermitente. Diversos estudos relataram a diminuição da intensidade dos picos na região UV após utilização do pós-tratamento aeróbio como etapa seguinte à descoloração reductiva (Amaral et al., 2017, 2014; Franciscon et al., 2009b).

Nos tratamentos com nível de aeração intermitente de 8 h.d<sup>-1</sup>, a análise do perfil UV-VIS indica que a biodegradação do cromóforo ocorreu com menor intensidade comparado aos demais ensaios (Figura 5.18). Na condição com 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose, houve mínima redução da

absorbância nos intervalos UV e VIS. Para a concentração de 3 g.L<sup>-1</sup>, porém, houve maior remoção de cor e aumento da área espectral associada à formação de intermediários da reação.

**Figura 5.18.** Espectros UV (A) e VIS (B) de efluente contendo DB22 em tempo inicial (afluente) e após 120 h de tratamento em condições experimentais distintas, identificadas como E-03 e E-09. E-03: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 8 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-09: 3 g.L<sup>-1</sup> glicose, 8 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.



É notável que, nos experimentos inteiramente anóxicos ou com maior nível de aeração intermitente (8 h.d<sup>-1</sup>), há maior acúmulo de compostos intermediários quando a concentração inicial de glicose é máxima (3 g.L<sup>-1</sup>). Possivelmente, o excesso de co-substrato é prejudicial à mineralização dos subprodutos gerados na redução do azo. Isto ocorre porque há preferência pela utilização de substratos menos tóxicos como fonte de equivalentes redutores para o metabolismo microbiano. Este efeito é reduzido nos ensaios com tempo de aeração de 4 h.d<sup>-1</sup> porque essas condições são ótimas à biodegradação dos metabólitos do processo estudado.

#### **5.4. Considerações sobre a comunidade microbiana degradadora de azo**

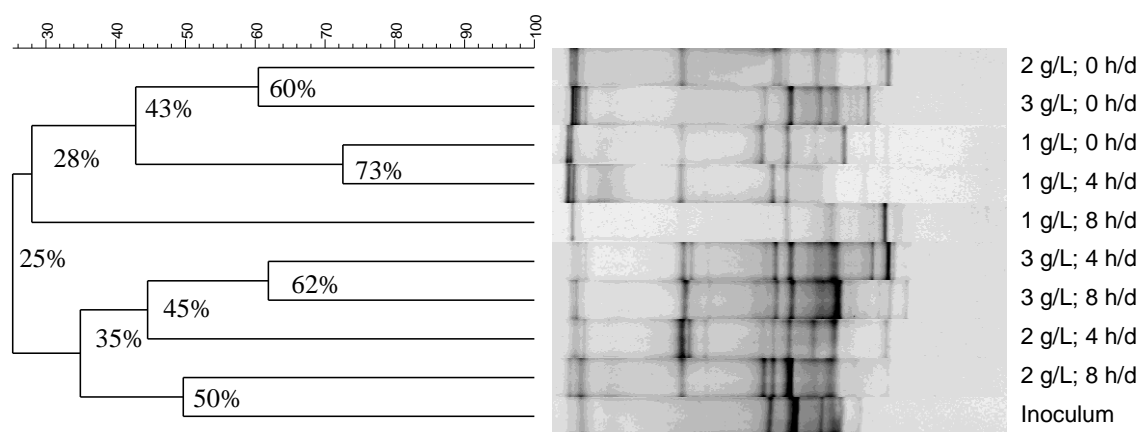
O consórcio de microrganismos envolvidos na biodegradação do DB22 foi caracterizado. Os resultados são apresentados em duas seções, organizadas de acordo com a ferramenta de análise e objetivos do método, a saber: i) análise da diversidade das comunidades microbianas (inóculo e condições identificadas como E-01 a E-09) por DGGE (Seção 5.5); e ii) sequenciamento massivo do gene 16S rRNA das amostras de inóculo e de ensaios modelos (experimentos E-02 e E-04), com a finalidade de identificar os principais grupos taxonômicos envolvidos na degradação do azo, bem como suas características – com base em estudos da literatura científica (Seção 5.6).

## 5.5. Análise da diversidade por DGGE

### 5.5.1. Análise multivariada do perfil de bandas

As regiões V6-V8 do rDNA 16S das amostras microbianas foram amplificadas por PCR com utilização dos primers 968FGC e 1401R. Os produtos foram aplicados em gel com gradiente desnaturante de 45 a 65%. Para a classificação das populações envolvidas em grupos relativamente homogêneos, realizou-se análise de cluster utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson como índice de similaridade. O dendograma ilustrado na **Figura 5.19** foi gerado com o algoritmo UPGMA.

**Figura 5.19.** Dendograma gerado por análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil de bandas do DGGE de fragmentos do rDNA 16S para o Domínio Bacteria.



O padrão de bandas demonstra que uma das populações presentes no inóculo se manteve em todas as condições experimentais. Este táxon também apresenta maior abundância no ensaio onde a concentração de glicose e aeração intermitente foram, respectivamente, de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $8 \text{ h.d}^{-1}$ . A remoção de cor média neste experimento foi de apenas 49,0%, sugerindo que a permanência desta população de bactérias em todos os ensaios, isoladamente, não é um indicativo da eficiência de degradação do composto azo. Provavelmente, como será demonstrado na seção 5.5.2, a eficiência do sistema está relacionada às associações sinérgicas entre diferentes populações bacterianas atuando na degradação do cromóforo.

A similaridade entre as comunidades microbianas do inóculo e dos experimentos fatoriais variou de 25-73%. Ainda, o dendograma apresenta uma separação acentuada entre dois grupos distintos, a saber: na parte superior, os ensaios onde não foram realizados ciclos de aeração (43% similaridade) ou onde a concentração do co-substrato utilizada foi de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  (28% similaridade); e, na parte inferior, todas as condições submetidas à aeração intermitente em conjunto com os níveis mais elevados de glicose ( $2 - 3 \text{ g.L}^{-1}$ ) e inóculo (35% similaridade).

As populações microbianas dos ensaios não-aerados apresentaram grande similaridade entre si. Nesta condição, o par de ensaios com maior nível do co-substrato (2 e 3 g.L<sup>-1</sup>) apresentou 60% de similaridade consigo e 43% de similaridade com o experimento em que foi utilizado 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Infere-se, desta forma, que as pressões seletivas atuaram de maneira similar nos testes sem aeração intermitente, favorecendo o desenvolvimento de bactérias que possuíam estratégias de sobrevivência na ausência de oxigênio, e.g. microrganismos anóxicos, anaeróbios e facultativos; ou, ainda, de bactérias aeróbias capazes de sobreviver utilizando apenas o oxigênio do headspace difundido na camada superior do meio reacional. Apesar disso, o par mais semelhante possuía como condição comum o menor nível de co-substrato, porém estratégias distintas de aeração (0 e 4 h.d<sup>-1</sup> aeração).

### 5.5.2. Índices ecológicos

Os índices  $H'$  e  $D$  foram calculados a partir das curvas densitométricas do perfil de bandas do DGGE. A **Tabela 5.12** lista os valores destes índices e a remoção de cor média obtida em cada experimento.

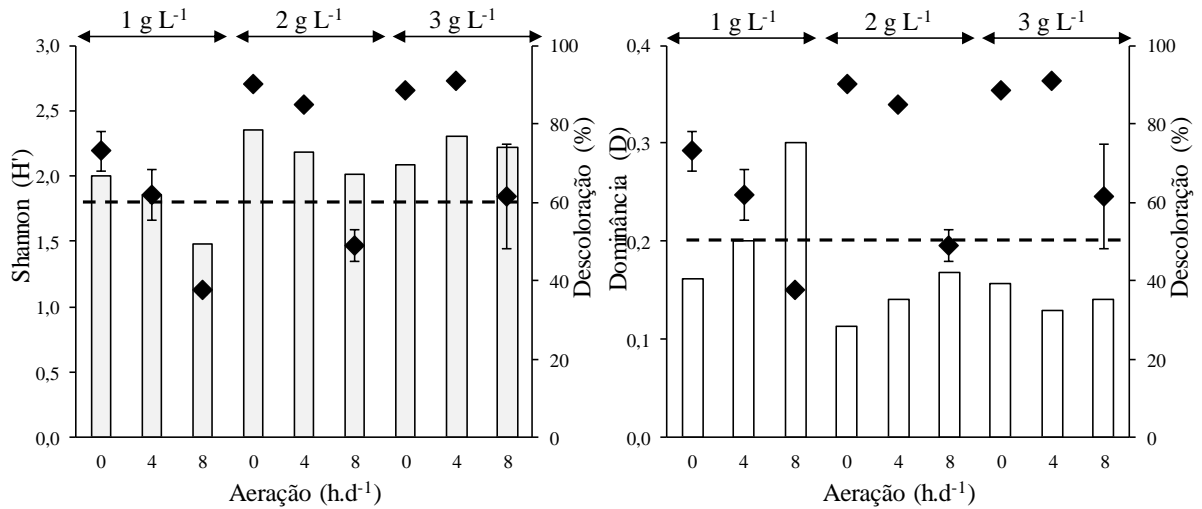
**Tabela 5.12.** Índices ecológicos de Shannon ( $H'$ ) e Dominância ( $D$ ) em amostras de biomassa coletadas ao fim de cada experimento fatorial e eficiência média de remoção de cor dos respectivos ensaios.

Ensaio	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Aeração (h.d <sup>-1</sup> )	Descoloração média (%)	Shannon ( $H'$ )	Dominância ( $D$ )
E-01	1	0	73,1	1,999	0,163
E-02	1	4	61,9	1,852	0,201
E-03	1	8	37,5	1,479	0,302
E-04	2	0	90,0	2,354	0,114
E-05	2	4	85,0	2,179	0,141
E-06	2	8	49,0	2,019	0,168
E-07	3	0	88,5	2,086	0,158
E-08	3	4	90,9	2,304	0,129
E-09	3	8	61,4	2,223	0,141

O índice  $H'$  é utilizado para estimar a diversidade alfa em uma amostra ambiental. Dois componentes contribuem neste cálculo: o número de populações e a equitabilidade, i.e. distribuição dos indivíduos entre essas populações (Peet, 1974). A **Figura 5.20** apresenta a relação entre as variáveis  $H'$ ,  $D$  e descoloração. Observa-se que a diversidade microbiana está relacionada à concentração inicial de co-substrato na AR e ao nível de aeração intermitente utilizado. Menores eficiências de remoção de cor foram obtidas nos experimentos em que foi utilizada a concentração de glicose de 1 g.L<sup>-1</sup> ou tempo de aeração de 8 h.d<sup>-1</sup>. Os valores calculados de  $H'$  também são inferiores nestes ensaios, sugerindo que a competição por doadores de elétrons pode ter limitado a diversidade de populações nas amostras e, portanto, a descoloração redutiva do azo.

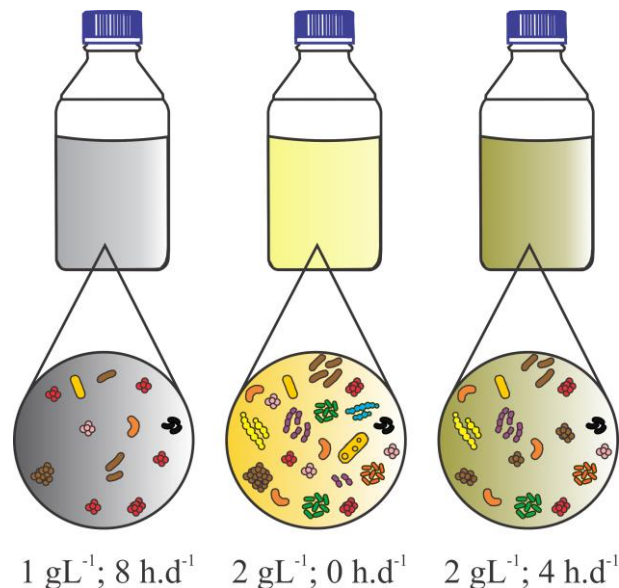
O mesmo pode ser inferido por meio do conceito de dominância. O índice  $D$  varia de 0 a 1, onde 1 é o valor que representa um único táxon dominando toda a comunidade microbiana (Hammer et al., 2001). De maneira análoga aos resultados obtidos com o índice  $H'$ , temos que existe uma relação clara entre os valores de  $D$  e as respectivas eficiências de remoção de cor. Entretanto, maiores valores de dominância implicaram em menores eficiências de descoloração, o que reforça a hipótese de que a diversidade microbiana é benéfica ao processo de descoloração redutiva.

**Figura 5.20.** Correlação entre remoção de cor e índices ecológicos em cada experimento (E-01 a E-09). Colunas indicam os valores dos respectivos índices e pontos indicam a eficiência de descoloração. A linha tracejada representa a diversidade ou dominância do inóculo.



Estes resultados podem ser explicados com o apoio dos estudos de Kurade et al. (2017) e Phugare et al. (2011), que observaram maior atividade de enzimas envolvidas na quebra da ligação azo quando foram utilizados consórcios microbianos ao invés de culturas puras. Os autores atribuíram o fato às interações sinérgicas entre diferentes comunidades microbianas atuando na degradação do cromóforo.

**Figura 5.21.** Representação da eficiência de remoção de cor e diversidade microbiana em experimentos modelos para fins de comparação.



Em um estudo não relacionado à biodegradação de compostos tóxicos, Benomar et al. (2015) verificaram os efeitos do estresse nutricional sobre o desenvolvimento de duas culturas de bactérias anaeróbias. Os autores observaram que a ausência de nutrientes essenciais induziu



a interações físicas entre as espécies, permitindo a emergência de novas propriedades no consórcio artificial. No estudo supracitado, foram observadas melhorias na produção de H<sub>2</sub> e crescimento máximo precoce quando as espécies cresceram em co-cultivo. O estresse causado pela presença do composto azo pode, de modo análogo, ter estimulado interações sinérgicas entre as populações; e as propriedades emergentes resultaram em melhores performances de remoção de cor.



### 5.6. Sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA

As amostras de biomassa do inóculo e de duas condições experimentais foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2000. Duas condições foram escolhidas, a saber: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose e tempo de aeração intermitente de 4 h.d<sup>-1</sup> (E-02) e 2 g.L<sup>-1</sup> glicose e tempo de aeração intermitente de 0 h.d<sup>-1</sup> (E-04) (**Figura 5.22**). Um total de 402.400 sequências foram obtidas mediante análise das três amostras, as quais foram agrupadas em 262 OTUs com 97% de similaridade. As sequências possuíam tamanho de 344 a 472 pb, com média de 465±6 pb e mediana de 466 pb. A maior parte das sequências possuía comprimento de 467 pb.

**Figura 5.22.** Parâmetros considerados na escolha dos experimentos alvos do sequenciamento do gene 16S rRNA.

	Descoloração	K	DQO residual	Shannon (H')	Biodegradação do DB22
E-02 (1 g/L glicose; 4 h/d aeração)		--	<b>A menor</b>	--	<b>A melhor</b>
E-04 (2 g/L glicose; 0 h/d aeração)		<b>A maior</b>	--	<b>A maior</b>	--

### 5.6.1. Índices ecológicos

O número de sequências obtidas foi utilizado para estimativa da diversidade e riqueza microbiana a nível das OTUs com 97% de similaridade. Os índices utilizados foram  $H'$ ,  $D$  e  $S_1$ . Para a análise de cobertura, utilizou-se o Índice de Good. Os valores são demonstrados na **Tabela 5.13**.

**Tabela 5.13.** Índices ecológicos de Shannon ( $H'$ ), Dominância ( $D$ ) e Chao-1 ( $S_1$ ) e outros parâmetros do sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras de biomassa coletadas no início (Inóculo) e ao fim dos ensaios E-02 e E-04. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup>.

	Inóculo	E-02	E-04
Shannon ( $H'$ )	1,959	2,865	3,392
Dominância ( $D$ )	0,326	0,195	0,062
Chao-1 ( $S_1$ )	231	241	237
OTUs	223	233	228
Número de sequências	15026	126166	125125
Índice de Good (Coverage)	0,9989	0,9999	0,9999

A amostra de inóculo apresentou a menor diversidade ( $H' = 1,96$ ), ante valores de  $H'$  de 2,87, em E-02, e de 3,39, em E-04. Estes resultados corroboram aqueles obtidos na análise da diversidade por DGGE (**Tabela 5.12**). Na ocasião, E-04 apresentara a maior diversidade de bactérias dentre todas as condições estudadas. Em geral, as amostras tratadas nas condições de 2 ou 3 g.L<sup>-1</sup> de co-substrato foram mais diversas que aquelas em que foi utilizada concentração inicial de glicose de 1 g.L<sup>-1</sup>, indicando que há forte correlação entre o parâmetro e a disponibilidade de equivalentes de redução.

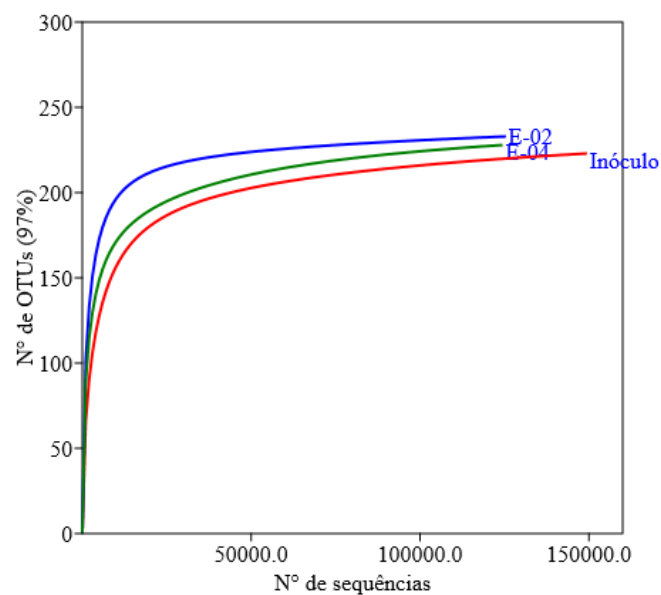
Inversamente, E-04 apresentou a menor dominância ( $D = 0,06$ ). Nas amostras de inóculo e E-02, os valores de  $D$  foram de 0,33 e 0,20, respectivamente. O meio de cultivo utilizado durante o enriquecimento do consórcio de inóculo possuía osmolaridade superior àquela da AR utilizada nos ensaios de batelada. Algumas populações podem ter sido selecionadas com base na tolerância às condições extremas de salinidade, explicando o elevado índice de dominância do consórcio de inóculo.

A riqueza das amostras também foi mensurada pelo estimador chao-1. Peet (1974) define riqueza como o número de espécies (aqui considerado OTUs com 97% de identidade) em uma amostra de tamanho constante. Os valores de  $S_1$  encontrados foram bastante similares

em ambas as amostras, variando entre 231 e 241. Isto indica que os indivíduos presentes no inóculo mantiveram-se nas demais condições, embora tenham variado suas proporções.

Em relação à rarefação, observa-se que o número de OTUs (97%) cresce com o aumento das sequências analisadas (**Figura 5.23**). As curvas de rarefação das amostras de inóculo, E-02 e E-04 se aproximam de um valor máximo, indicando que o número de sequências avaliadas foi adequado para a estimativa da riqueza microbiana. Isto é reforçado pelo índice de Good, que assume valores entre 0,9989 e 0,9999, indicando que a quase totalidade de indivíduos foi amostrada, i.e. os dados reproduzem as comunidades microbianas observadas (Good, 1953; Lemos et al., 2011).

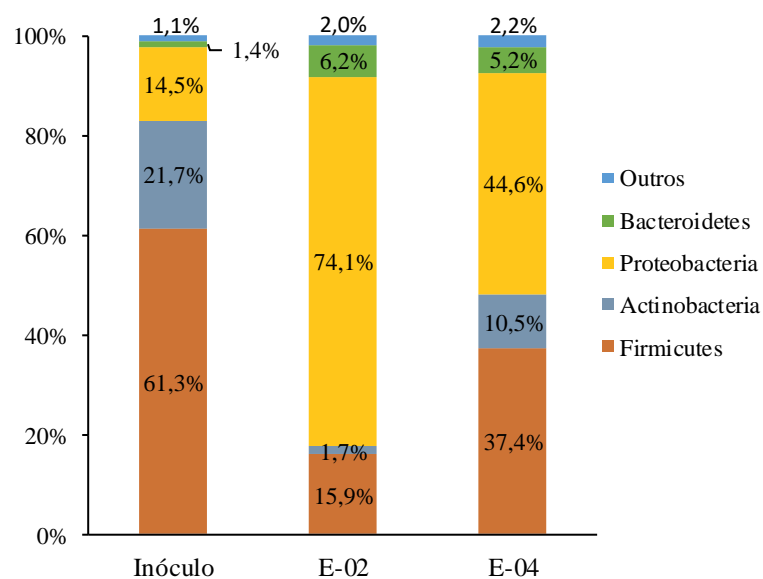
**Figura 5.23.** Curvas de rarefação definidas para OTUs com 97% de similaridade das sequências das amostras de Inóculo, E-02 e E-04. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup>.



### 5.6.2. Caracterização filogenética

Os resultados do sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA revelaram uma predominância de membros dos filos *Firmicutes* (61,3%) e *Actinobacteria* (21,7%) no inóculo. *Proteobacteria* (14,5%) e *Bacteroidetes* (1,4%) também estiveram presentes, em menor proporção, como demonstrado na **Figura 5.24**.

**Figura 5.24.** Abundância relativa dos principais filos do domínio Bacteria presentes nas amostras do inóculo e de duas condições experimentais distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.



Os *Firmicutes* compreendem as bactérias ácido-lácticas, além de membros das ordens *Bacillales* e *Clostridiales*. São gram-positivas e numerosas no solo, características essas comuns ao filo *Actinobacteria* – também numeroso na amostra do inóculo (Barka et al., 2016; Madigan et al., 2014). A utilização de solo e madeira pútrida, como fonte de microrganismos, possivelmente favoreceu a obtenção de indivíduos de *Firmicutes* e *Actinobacteria* em grande número durante a etapa de enriquecimento.

Os filos dominantes no tempo inicial do experimento, no entanto, tiveram suas proporções significativamente reduzidas no experimento E-02 (1 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 4 h.d<sup>-1</sup> aeração). Por outro lado, *Proteobacteria* aumentou a sua abundância relativa de 14,5% a 74,1%, sendo a vasta maioria pertencentes à classe *Gamma-proteobacteria*. Este é o maior e mais versátil filo, compreendendo bactérias gram-negativas aeróbias, microaerofílicas e aeróbias facultativas (Madigan et al., 2014). Isto demonstra que a presença da estratégia de aeração intermitente favoreceu a seleção de populações distintas daquelas que predominavam no inóculo, cujas condições de cultivo eram estáticas, i.e. sem agitação ou aeração e com

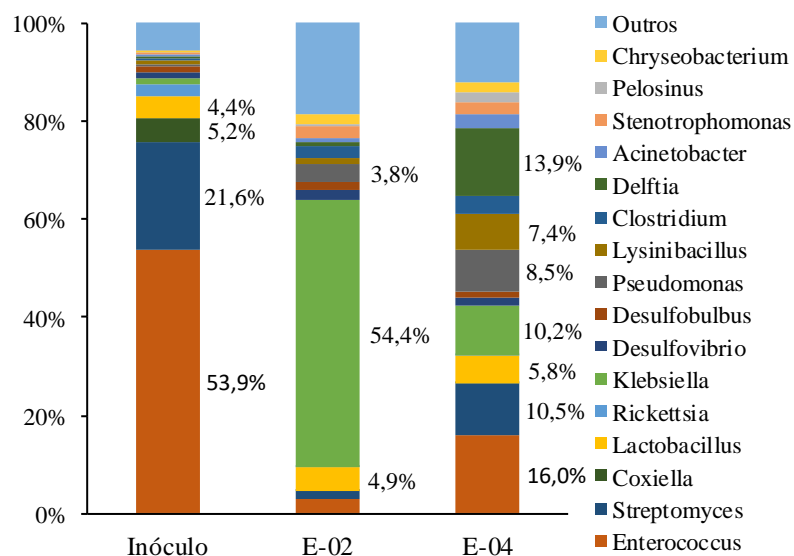
*headspace* conectado à atmosfera. Para a condição de 2 g.L<sup>-1</sup> de glicose e ausência de aeração intermitente (E-04), também houve predominância de *Proteobacteria* (44,6%). Entretanto, *Firmicutes* e *Actinobacteria* mantiveram-se em proporções elevadas, de 37,4 e 10,5%, respectivamente. Os membros de *Bacteroidetes*, escassos na amostra de inóculo (1,4%), foram positivamente selecionados durante ambos os experimentos, i.e. 6,2% em E-02 e 5,2% em E-04.

A presença massiva de *Proteobacteria* nos experimentos condiz com a realidade de outros estudos envolvendo a biodegradação de azo de AR sintética. Em experimento envolvendo a descoloração do Remazole Black 5 em reator anóxico, Dafale et al. (2010) constataram que 48% da população de microrganismos pertencia à classe *Gamma-proteobacteria*. Bafana et al. (2008) verificaram um domínio desta classe (54%) em um consórcio microbiano proveniente de lodos ativados após adaptação ao Direct Black 38. *Firmicutes* (19%), *Beta-proteobacteria* (14%), *Bacteroidetes* (10%) e *Actinobacteria* (3%) também estiveram presentes. Forss et al. (2013) caracterizaram um consórcio microbiano proveniente de madeira de região florestal capaz de degradar o Reactive Black 5 e Reactive Red 2. Observou-se predominância de *Firmicutes* e de *Bacteroidetes* na composição do biofilme do reator anaeróbio, mas representantes de *Proteobacteria* também foram identificados.

No nível de gênero, observou-se que a maioria dos indivíduos identificados é capaz de produzir azoredutases, sugerindo que esta foi a principal via enzimática de degradação do azo. Enzimas do complexo ligninolítico e outras enzimas oxido-redutases não-específicas também podem ter atuado no processo, visto que a atividade dessas proteínas foi detectada em outros estudos envolvendo a descoloração de azo por indivíduos de alguns dos gêneros presentes no experimento (**Figura 5.25** e **Quadro 5.1**).

No inóculo, houve predominância de indivíduos semelhantes a *Enterococcus*, que se apresenta com uma abundância de 53,9% relativa ao domínio Bacteria. O gênero pertence à ordem das bactérias ácido lácticas, i.e. que têm o ácido láctico como principal produto da fermentação (Madigan et al., 2014). Membros da ordem *Lactobacillales* são anaeróbios tolerantes ao oxigênio (Madigan et al., 2014), o que explica a sua abundância no ambiente anóxico do cultivo. Os *Enterococcus*, em particular, crescem em ambientes salinos e com valores de pH da ordem de 9,6, encontrando no meio de cultivo utilizado, portanto, condições favoráveis à replicação celular (Byappanahalli et al., 2012).

**Figura 5.25.** Abundância relativa dos principais gêneros do domínio Bacteria presentes nas amostras do inóculo e de duas condições experimentais distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.



**Quadro 5.1.** Principais gêneros bacterianos presentes nos experimentos os quais foram previamente associados à descoloração de corantes azo em outros estudos. Aspectos gerais e via enzimática de degradação do cromóforo.

Gênero	Gram	Condição	Via enzimática de descoloração	Referências
<i>Enterococcus</i>	+	Anaeróbia e anóxica	Azoreductase	Chen et al. (2004); Chung et al. (1992); Scheline et al. (1970); Wang et al. (2004)
<i>Streptomyces</i>	+	Anóxica	Enzimas do complexo ligninolítico	Pasti-Grigsby et al. (1992); Paszczynski et al. (1992, 1991)
<i>Lactobacillus</i>	+	Anaeróbia e anóxica	Azoreductase	Chen et al. (2009); Elbanna et al. (2010); Seesuriyachan et al. (2007); Wong e Yuen (1996); You e Teng (2009)
<i>Klebsiella</i>	-	Aeróbia, microaerofílica, anóxica e anaeróbia	Azoreductase	Cui et al. (2012); Franciscon et al. (2009); Yu et al. (2012); Zhang et al. (2010)
<i>Pseudomonas</i>	-	Anóxica	Azoreductase, NADH-DCIP redutase e enzimas do complexo ligninolítico	Chang et al. (2001); Hsueh e Chen (2007); Phugare et al. (2011); Telke et al. (2010); Zimmermann et al. (1982)
<i>Stenotrophomonas</i>	-	Aeróbia	Enzimas do complexo ligninolítico	Galai et al. (2009)
<i>Lysinibacillus</i>	+	Anóxica	Azoreductase, NADH-DCIP redutase, riboflavina redutase e enzimas do complexo ligninolítico	Saratale et al. (2013)

Apesar de *Enterococcus* ser o gênero dominante no início dos experimentos, observou-se um declínio na proporção desses indivíduos durante os ensaios. O gênero passou a integrar 3,0 e 16,0% da comunidade bacteriana dos experimentos E-02 e E-04, respectivamente, indicando que a aeração descontínua desfavoreceu o crescimento destes indivíduos.

A descoloração de corantes azo por *Enterococcus* foi relatada por diversos autores (Chen et al., 2004; Chung et al., 1992; Scheline et al., 1970; Wang et al., 2004). Estes estudos associam a capacidade de degradação do azo à produção de enzimas da classe azoredutase pelo gênero. Em geral, a enzima depende da presença de cofatores enzimáticos – e.g. NADH, NADPH, Riboflavina, FMN, entre outros – e ausência de oxigênio para catalisar a reação de quebra da ligação que causa cor. No entanto, Chen et al. (2004) caracterizaram uma azoredutase de *Enterococcus* capaz de degradar diversos corantes azo em condições aeróbias.

Bactérias similares a *Streptomyces* também estiveram presentes na amostra do inóculo (21,6%). O gênero foi igualmente desfavorecido na presença de aeração intermitente (abundância relativa de 1,6% nesta condição), embora tenha se mantido em proporção significativa no experimento não aerado (10,5%).

Este gênero é comumente encontrado em solos alcalinos e pode produzir enzimas hidrolíticas (Madigan et al., 2014), característica desejável no processo de biodegradação de compostos aromáticos. Estudos demonstraram que estirpes de *Streptomyces* foram capazes de degradar corantes azo sulfonados e o ácido sulfanílico, um metabólito comum, após modificações na estrutura química destas moléculas para conferir maior semelhança à lignina. Alguns corantes comerciais, inalterados, não foram degradados (Pasti-Grigsby et al., 1992; Paszczynski et al., 1992, 1991). Ademais, Pasti e Crawford (1991) observaram uma forte correlação entre a capacidade de degradação da lignina e a descoloração de dois corantes antraquinona por *Streptomyces*. Os autores concluíram que enzimas ligninolíticas produzidas pelas estirpes atuaram na degradação destes compostos. Estes estudos indicam que o gênero pode atuar na biodegradação de compostos aromáticos que possuem padrões em suas estruturas semelhantes à lignina, que é o caso de muitos corantes da classe azo.

Bactérias similares a *Lactobacillus* mantiveram-se em proporções semelhantes às iniciais ao final das duas condições experimentais investigadas (4,9% em E-02 e 5,8% em E-04). Assim como *Enterococcus*, o gênero integra a lista de microrganismos da flora intestinal capazes de produzir azoredutase (Chung et al., 1992). Em um estudo de Seesuriyachan et al. (2007), uma estirpe de *Lactobacillus* isolada do solo de uma indústria de laticínios teve o melhor

desempenho na biodegradação do corante Methyl Orange, dentre 19 isolados testados, em ensaios de condição microaerofílica. Os autores observaram que a reação foi catalisada por uma azoredutase dependente de NADH e presente no citosol das células. Os autores inferiram, ainda, que o processo teve participação de mediadores de óxido-redução, visto que a elevada massa molecular do composto azo sulfonado torna pouco provável a formação do complexo enzima-substrato dentro do citoplasma. Reactive Black 5, Methyl Red, Amaranth, Orange II, Eriochrome Red B, dentre outros, também estão entre os compostos reportados em estudos envolvendo a degradação de azo por *Lactobacillus* (Chen et al., 2009; Elbanna et al., 2010; You e Teng, 2009).

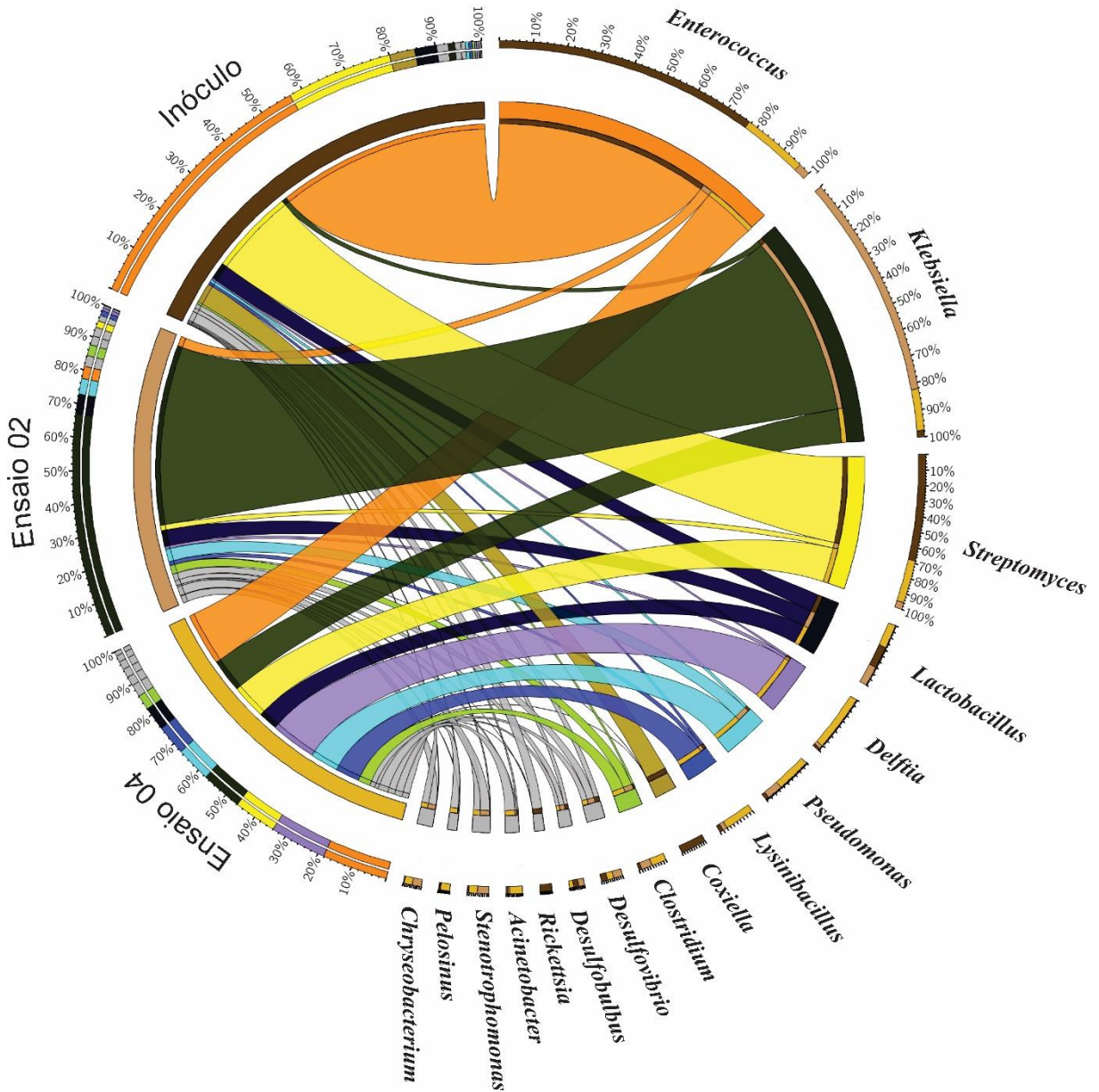
Bactérias similares a *Klebsiella*, com abundância relativa de apenas 1,3% no inóculo, aumentaram suas proporções para 54,4% em E-02. *Klebsiella* pertence à ordem dos *Enterobacteriales*, grupo de bactérias aeróbias facultativas com morfologia do tipo bacilo (Madigan et al., 2014). O resultado indica que a presença de ciclos de aeração permitiu a seleção destes indivíduos em detrimento de microrganismos aeróbios estritos, pois estes últimos não possuem estratégia de sobrevivência nos períodos de ausência de oxigênio.

Bactérias do gênero *Klebsiella* foram mencionadas em estudos envolvendo a degradação de azo em condições aeróbias ou microaerofílicas (Cui et al., 2012; Franciscon et al., 2009b; Wong e Yuen, 1996; Yu et al., 2012; Zhang et al., 2010). Wong e Yuen (1996) utilizaram *Klebsiella pneumoniae* para descoloração do Methyl Red em meio oligotrófico. Franciscon et al. (2009) observaram que uma estirpe do gênero foi capaz de degradar diversos corantes da classe. As aminas aromáticas geradas também foram biodegradadas quando prevaleceram condições aeróbias no experimento. Cui et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes ao comparar a performance de um consórcio facultativo, composto por *Klebsiella* e outros gêneros, na degradação de um corante azo em meios aeróbio e anaeróbio.

No ensaio E-04, diversos gêneros pouco abundantes no tempo inicial do experimento assumiram proporções elevadas. Congêneres de *Pseudomonas* aumentaram sua abundância relativa de 0,7 a 8,5%. Bactérias similares a *Delftia*, que compunham apenas 0,4% da amostra de inóculo, passaram a integrar 13,9% do total de populações do ensaio. Gêneros semelhantes a *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pelosinus*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*, entre outros, estão entre as taxa positivamente selecionadas neste ensaio.



**Figura 5.26.** Representação circular dos gêneros microbianos com maiores valores de abundância relativa no inóculo e em duas condições experimentais distintas. Ensaio 02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; Ensaio 04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.



Bactérias do gênero *Pseudomonas* são potenciais produtoras de azoredutase e de enzimas modificadoras da lignina (Phugare et al., 2011; Telke et al., 2010; Zimmermann et al., 1982). Embora esses microrganismos possam crescer aerobiamente, Chang et al. (2001) constataram que a presença de oxigênio dissolvido retardou a descoloração do corante azo Reactive Red 22 por uma estirpe do gênero. Em um estudo desenvolvido por Hsueh e Chen (2007), *Pseudomonas luteola* descoloriu diversos compostos da classe, à exceção do Methyl Red.

O gênero *Pseudomonas* é particularmente importante na biodegradação de compostos aromáticos produzidos no processo de descoloração. Estas bactérias demonstram ser portadoras de genes responsáveis pela rota catabólica de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), incluindo o naftaleno (Whyte et al., 1997). Ademais, essas bactérias são capazes de metabolizar a anilina, outro potencial subproduto da degradação do DB22 (Konopka et al., 1989).

*Delftia*, táxon abundante em E-04, também foi associado à biodegradação da anilina. O gênero é capaz de utilizar o composto como fonte exclusiva de carbono para crescimento celular (Liu et al., 2002; XIAO et al., 2009). Apesar disso, Liu et al. (2002) constataram que derivados da anilina, e.g. ácido sulfanílico, não sustentaram o crescimento de uma estirpe investigada.

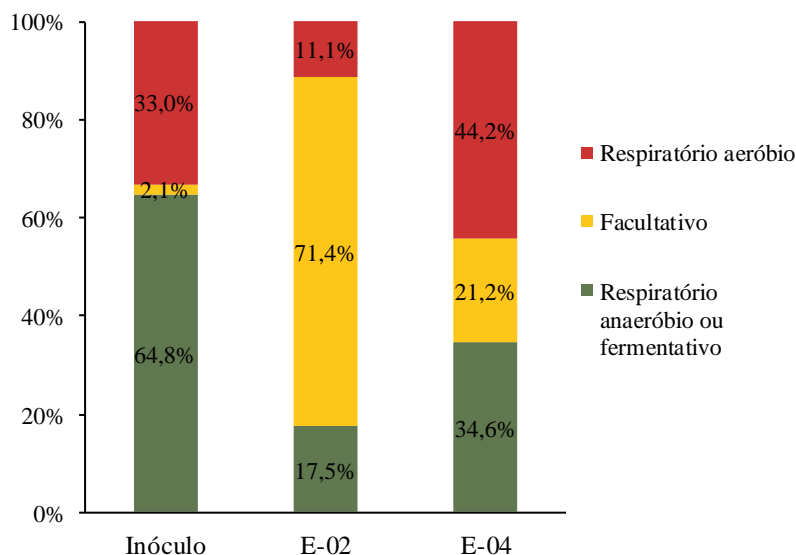
Bactérias análogas a *Stenotrophomonas* estiveram em proporções de 2,7 e 2,1% nos experimentos E-02 e E-04, respectivamente. *Stenotrophomonas maltophilia*, espécie do gênero, possui a habilidade de degradar compostos fenólicos, HPAs e diversos xenobióticos (Ryan et al., 2009). Em estudo desenvolvido por Galai et al. (2009), uma estirpe de *S. maltophilia* isolada do solo promoveu a descoloração dos corantes Congo Red e Methyl Orange em meio Luria Bertani. Os autores detectaram atividade de lacase no extrato enzimático.

Ainda na amostra E-04, houve aumento da proporção dos aeróbios semelhantes a *Lysinibacillus* (7,4%) e *Acinetobacter* (3,0%). Ambos os gêneros foram previamente associados à biodegradação de compostos aromáticos. Misal et al. (2014) analisaram uma azoredutase produzida por *Lysinibacillus sphaericus*. A enzima utilizava o NADH como doador preferencial de elétrons e catalisou a descoloração de diversos corantes da classe azo. Em outro estudo, uma estirpe do gênero isolada de solo conduziu a biodegradação completa do Remazol Red. A atividade enzimática de diversas enzimas óxido-redutases foi detectada, incluindo a azoredutase, lacase, álcool veratrílico oxidase, NADH-DCIP redutase e lignina peroxidase (Saratale et al., 2013). *Acinetobacter*, por sua vez, possui genes codificadores de enzimas que podem catabolizar compostos aromáticos como o fenol e a anilina (Mazzoli et al., 2007; Thangaraj et al., 2008).

### 5.6.3. Classificação das bactérias com base no metabolismo celular

A proporção entre microrganismos anaeróbios e/ou fermentativos, facultativos e aeróbios, relativa aos principais gêneros observados, é demonstrada na **Figura 5.27**. Houve predominância de bactérias com metabolismo respiratório anaeróbio e fermentativo na amostra de inóculo (64,8%). Em E-02, observou-se aumento significativo de bactérias facultativas, que passaram a integrar 71,4% do total de populações analisadas. A alternância da presença de oxigênio, nessas condições, selecionou indivíduos versáteis, como as bactérias semelhantes a *Klebsiella* e *Pseudomonas*. Em E-04, os organismos com metabolismo estrito voltam a predominar, embora a presença de bactérias facultativas seja de 21,2%, muito superior à apresentada pelo inóculo. A predominância de aeróbios (44,2%), nesta condição, pode ser atribuída à difusão do oxigênio presente no *headspace* através da camada superior do meio reacional, visto que não houve aeração nesta condição. Destes indivíduos, a grande maioria está relacionada à biodegradação de compostos aromáticos, indicando que a condição foi propícia ao desenvolvimento de microrganismos capazes de degradar possíveis metabólitos do DB22.

**Figura 5.27.** Proporção relativa de bactérias anaeróbias ou fermentativas, facultativas e aeróbias dentre os principais gêneros presentes nas amostras de inóculo e de duas condições experimentais distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup>.

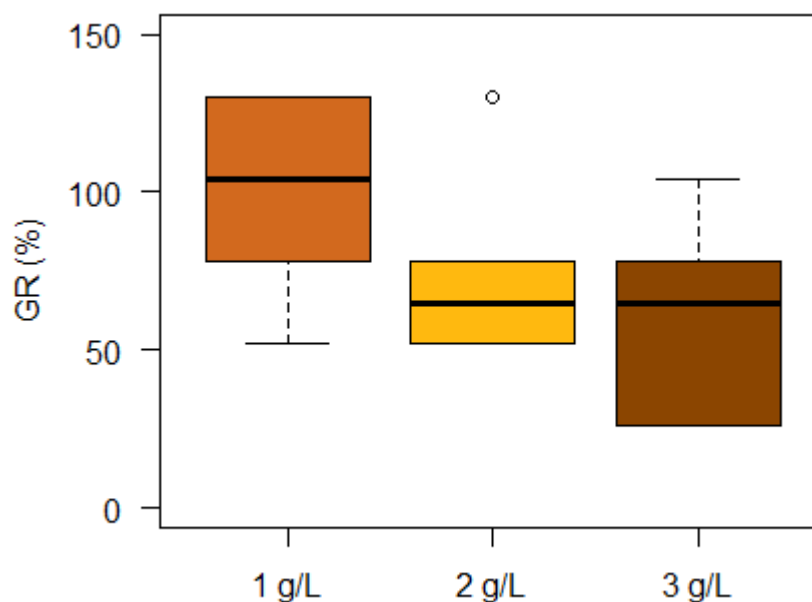


## 5.7. Ecotoxicidade

### 5.7.1. Ensaio de toxicidade com semente de *Lactuca sativa*

Os testes agudos de fitotoxicidade foram realizados com sementes de *L. sativa*. Preliminarmente, foram conduzidos ensaios com os componentes inorgânicos da AR, sem a presença do corante. O objetivo desta etapa foi avaliar o efeito da concentração do sal utilizado como fonte de alcalinidade ( $\text{NaHCO}_3$ ). Os resultados são demonstrados no boxplot da **Figura 5.28**.

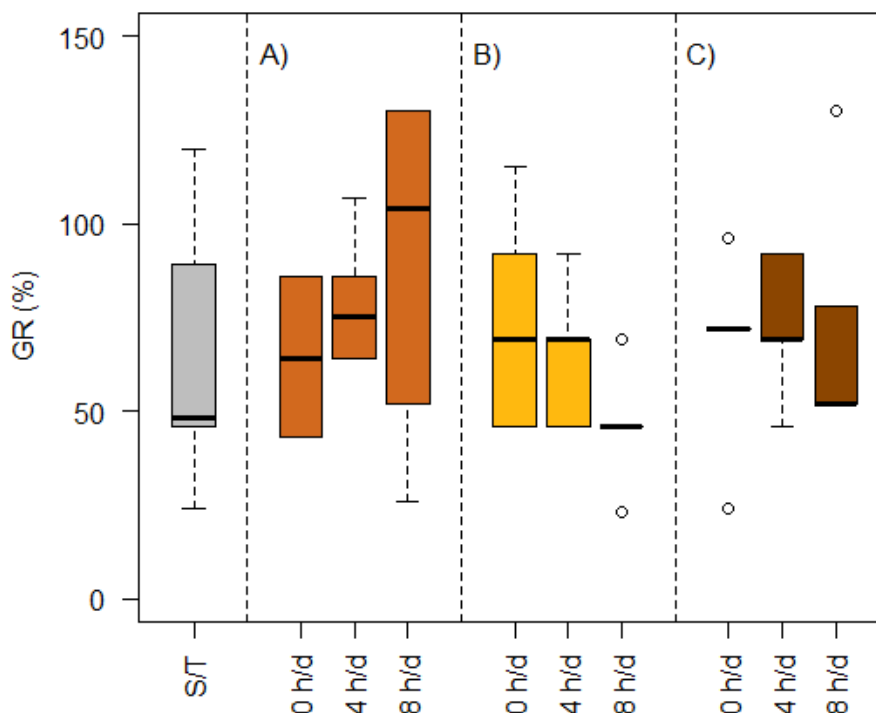
**Figura 5.28.** Taxa de germinação (GR) de sementes de *L. sativa* incubadas com as frações inorgânicas da AR sintética com concentração variável de  $\text{NaHCO}_3$  (1 – 2 – 3  $\text{g.L}^{-1}$ ). Demais componentes:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,25  $\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0,50  $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $\text{NaCl}$  (0,50  $\text{g.L}^{-1}$ ). Ensaio realizado em sextuplicata, com 5 sementes por réplica.



O teste de normalidade mostrou que as respostas não têm distribuição normal (Shapiro-Wilk,  $p < 0,05$ ). Neste sentido, realizou-se teste de Kruskal-Wallis para comparação das medianas, em que se constatou que não houve diferença estatística significativa entre os valores de GR, a 95% de probabilidade. Isto indica que ensaios com distintas concentrações de  $\text{NaHCO}_3$ , na faixa de 1-3  $\text{g.L}^{-1}$ , podem ser comparados quanto à eficiência de remoção de toxicidade causada pelos contaminantes orgânicos, que são removíveis biologicamente. Resultados semelhantes foram obtidos para a AR sintética bruta, variando-se a concentração de glicose. Observou-se que não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as medianas de GR das amostras de efluente sintético com distintas concentrações de glicose (1, 2 e 3  $\text{g.L}^{-1}$ ) e de  $\text{NaHCO}_3$  (1:1 g-glicose).

Os ensaios definitivos foram realizados com a premissa de que todas as amostras de AR não-tratada têm o mesmo efeito sobre GR, a despeito da concentração de glicose e de  $\text{NaHCO}_3$ , e portanto os ensaios são equiparáveis. Os resultados são demonstrados na **Figura 5.29**.

**Figura 5.29.** Taxa de germinação (GR) de sementes de *L. sativa* incubadas com efluente têxtil sintético contendo DB22 ( $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) após tratamento biológico em diferentes condições experimentais. S/T: efluente sem tratamento. Concentrações de glicose testadas: A)  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ; B)  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ; e C)  $3 \text{ g.L}^{-1}$ . Ensaios realizados em sextuplicata, com 5 sementes por réplica.



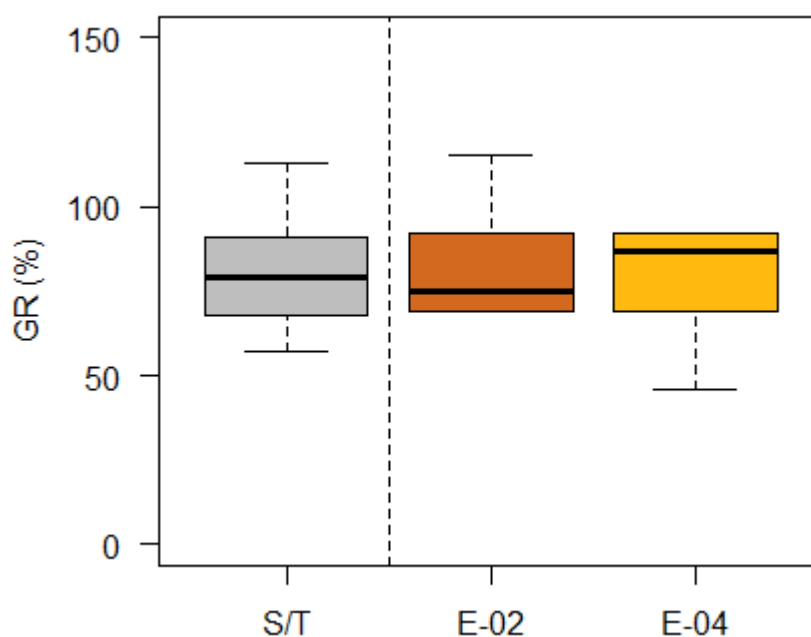
O teste de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferença estatística significativa, a 95% de probabilidade, entre as medianas dos valores de GR das amostras de AR bruta e após tratamento nas diferentes condições. O teste foi realizado após constatação de que os dados não aderem à normalidade (Shapiro-Wilk,  $p < 0,05$ ).

Novos ensaios, com maior número de sementes por placa, foram conduzidos para duas das condições experimentais, a saber: E-02 e E-04. O novo experimento foi realizado com o objetivo de confirmar os resultados do teste anterior. E-02 foi responsável pela maior remoção – ou menor produção – de metabólitos e menor DQO residual, enquanto E-04 destacou-se pelo maior valor de K e maior diversidade microbiana. Os resultados do experimento são demonstrados no boxplot da **Figura 5.30**.

No novo experimento, a variável GR apresentou distribuição normal (Shapiro-wilk,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística significativa, a 95% de probabilidade, entre as médias

de GR das amostras tratadas nas duas condições, segundo teste de ANOVA. Os valores médios de GR foram de  $83\pm 18$  e  $79\pm 18\%$ , respectivamente, para E-02 e E-04 (Tabela 5.14). As médias também não diferiram em relação aos resultados dos respectivos efluentes antes do tratamento biológico.

**Figura 5.30.** Taxa de germinação (GR) de sementes de *L. sativa* incubadas com efluente têxtil sintético contendo DB22 ( $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) após tratamento biológico em duas condições experimentais distintas. S/T: sem tratamento; E-02:  $1 \text{ g.L}^{-1}$  glicose,  $4 \text{ h.d}^{-1}$  aeração intermitente; E-04:  $2 \text{ g.L}^{-1}$  glicose,  $0 \text{ h.d}^{-1}$  aeração intermitente. Ensaios realizados em sextuplicata, com 10 sementes por réplica.



**Tabela 5.14.** Taxa de germinação (GR) média, comprimento total da radícula (RLS) e índice de germinação (GI) das amostras de duas condições distintas, antes e após tratamento biológico por 120 h. E-02:  $1 \text{ g.L}^{-1}$  glicose,  $4 \text{ h.d}^{-1}$  aeração intermitente; E-04:  $2 \text{ g.L}^{-1}$  glicose,  $0 \text{ h.d}^{-1}$  aeração intermitente. Ensaios realizados em sextuplicata, com 10 sementes por réplica.

	t (h)	GR (%)	RLS (mm)	GI
E-02	0	$83\pm 14$	28,9	0,27
	120 <sup>a</sup>	$83\pm 18$	62,7	0,62
E-04	0	$81\pm 19$	80,7	0,73
	120 <sup>b</sup>	$79\pm 18$	52,7	0,49

<sup>a</sup> pH 7,4, DQO =  $350 \text{ mg.L}^{-1}$ , descoloração = 65,6%; <sup>b</sup> pH 7,4, DQO =  $2150 \text{ mg.L}^{-1}$ , descoloração = 84,4%.

O Índice de Germinação (GI) também foi utilizado como parâmetro para medir a eficiência de remoção de fitotoxicidade pelo tratamento biológico. O GI combina a taxa de germinação das sementes e medidas do alongamento da radícula, sendo um indicador de ecotoxicidade mais completo e mais sensível (Priac e Badot, 2017). Embora as médias de GR dos ensaios distintos não tenham apresentado diferença estatística entre si, o GI indica que E-

04 apresentou maior toxicidade à *L. sativa* em comparação com E-02, ambos após tratamento biológico por 120 h.

Na literatura científica, Lumbaque et al. (2017) não observaram mudanças nos resultados de alguns parâmetros de toxicidade, em ensaios agudos com sementes de *L. sativa*, após tratamento físico-químico do Reactive Black 5 em processo redutivo (PR) e PR + processo fenton. Outros autores reportaram o aumento de fitotoxicidade a este bioindicador após descoloração de corantes azo por fotólise direta, processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou tratamento biológico (Almeida et al., 2016; Franco e Azevedo, 2014).

Observa-se, também, que o efluente bruto utilizado no experimento E-02 apresentou GI muito inferior a E-04, o que pode estar relacionado às diferentes concentrações iniciais de co-substrato dessas amostras. Harigaya e Takahashi (2018) estudaram o efeito da concentração de glicose sobre o desenvolvimento da radícula de *L. sativa* durante germinação na ausência de luz. Os autores observaram que a presença do composto, nas concentrações de 3-30 g.L<sup>-1</sup>, estimulou o crescimento da raiz em relação ao controle, o que está relacionado à função do composto como fonte de energia, constituinte estrutural e interação com diversos hormônios (Gibson, 2004; Harigaya e Takahashi, 2018). Efeito similar pode ter ocorrido em E-04<sup>12</sup>, o que causou a distorção no valor do respectivo índice.

Em suma, observou-se que o tratamento biológico não diminuiu a inibição da germinação das sementes de *L. sativa*, o que deve estar relacionado à toxicidade motivada pelos constituintes inorgânicos. Entretanto, outros parâmetros indicaram que o experimento E-02 apresentou menor toxicidade ao bioindicador, sugerindo que houve maior biodegradação do DB22 e de outros compostos orgânicos tóxicos na presença de aeração intermitente.

---

<sup>12</sup> As concentrações iniciais de glicose nos ensaios E-02 e E-04 eram de 1 e 2 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores proporcionaram concentrações de DQO de 1,3 e 2,4 g.L<sup>-1</sup> aos respectivos efluentes brutos.

### 5.7.2. Ensaios de toxicidade com *Daphnia magna*

Amostras dos ensaios E-02 e E-04 foram submetidas a ensaios agudos de toxicidade com neonatos de *D. magna*. Os resultados são demonstrados na **Tabela 5.15** e **Figura 5.31**.

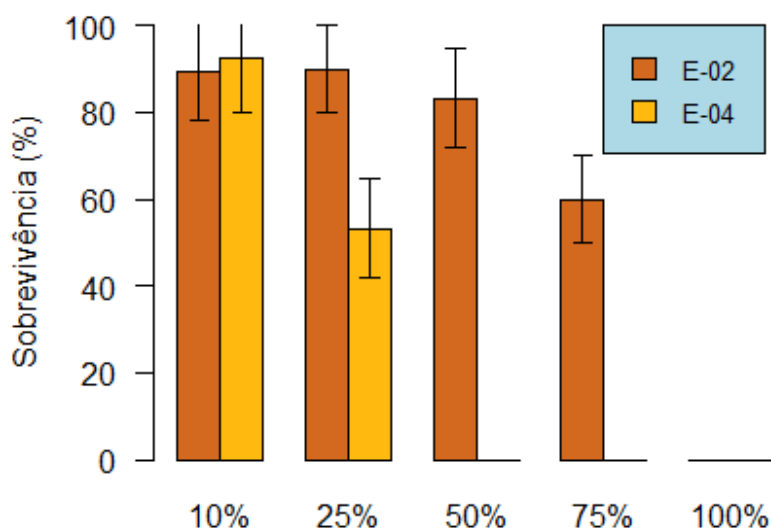
**Tabela 5.15.** Sobrevivência média de neonatos de *D. magna* expostos durante 48 h a diferentes diluições de amostras de efluente têxtil sintético contendo DB22 (32,5 mg.L<sup>-1</sup>), antes e após tratamento biológico por 120 h em duas condições distintas; e valor estimado da CE<sub>50</sub>/DIL. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.

	t (h)	Sobrevivência (%)					CE <sub>50</sub> /DIL
		10%	25%	50%	75%	100%	
E-02 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	-
	120	89±11	90±10	83±11	60±10	0	77±2
E-04 <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	-
	120	93±13	53±12	0	0	0	26±1

<sup>a</sup>pH 7,4, condutividade: 3070 µS.cm<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>pH 7,4, condutividade: 3770 µS.cm<sup>-1</sup>. Parâmetros medidos no início dos experimentos.

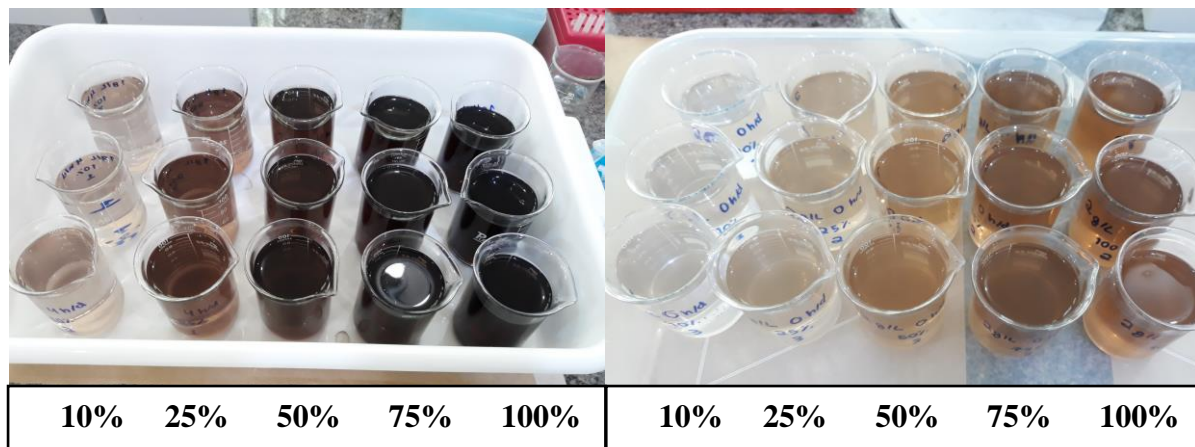
Não houve sobreviventes nas amostras de AR sem tratamento (t=0 h) em nenhuma das diluições testadas. Após tratamento biológico, porém, a sobrevivência média dos neonatos nos testes com diluição de 1:10 aumentou para 89±11 e 93±13% nos ensaios E-02 e E-04, respectivamente. Na diluição de 1:4, a sobrevivência média oscilou para 90±10% em E-02, enquanto o seu valor decresceu para 53±12% em E-04. O valor estimado da CE<sub>50</sub>/DIL foi de 77±2% para a condição E-02, muito superior ao valor de 26±1% calculado para amostras do ensaio E-04.

**Figura 5.31.** Sobrevivência média de neonatos de *D. magna* expostos durante 48 h a diferentes diluições de amostras de efluente têxtil sintético contendo DB22 (32,5 mg.L<sup>-1</sup>) após tratamento biológico por 120 h em duas condições distintas. E-02: 1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente; E-04: 2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente.





**Figura 5.32.** Disposição de Béqueres (100 mL) em ensaios agudos de ecotoxicidade utilizando *D. magna* como bioindicador. À esquerda, experimento E-02 (1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente) e, à direita, experimento E-04 (2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente).



A menor toxicidade ao bioindicador *D. magna* após tratamento na condição identificada como E-02 pode ser atribuída à biodegradação de subprodutos da descoloração do DB22 e à maior remoção de matéria orgânica nos experimentos com aeração intermitente. Como visto na seção 5.3, a utilização de 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose e tempo de aeração intermitente de 4 h.d<sup>-1</sup> propiciou a maior redução na área sob a curva de absorção espectral no intervalo UV. Ademais, a DQO residual deste ensaio foi significativamente inferior àquela obtida na condição E-04. Observe, portanto, que a remoção de matéria orgânica e de compostos intermediários proporcionou maior redução de ecotoxicidade da AR, embora a descoloração tenha sido superior no experimento não-aerado.

Em estudo envolvendo a biodegradação do DB22 em um sistema de fluxo contínuo, Amaral et al. (2014) observaram que não houve redução da toxicidade à *D. magna* na amostra de um efluente têxtil tratado em condição anaeróbia. Após utilização do pós-tratamento aeróbio, porém, a ecotoxicidade dessa AR reduziu significativamente. Franciscon et al. (2009a, 2009b), em estudos com o mesmo bioindicador, observaram que houve diminuição da taxa de mortalidade dos organismos-teste após a biodegradação de uma mistura de diferentes tipos de corantes azo em tratamento sequencial microaerofílico-aeróbio.

Nota-se que o uso da aeração intermitente contribuiu para a redução significativa na taxa de mortalidade de *D. magna*. Sabe-se que as amins aromáticas são recalcitrantes ao tratamento anaeróbio, embora sejam facilmente degradáveis em condições aeróbias (Pandey et al., 2007). A presença do oxigênio melhorou a eficiência de degradação de intermediários

tóxicos e de demais compostos orgânicos que conferem DQO, reduzindo a ecotoxicidade da AR analisada.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE AS HIPÓTESES DE ESTUDO

**Hipótese A:** Os microrganismos obtidos de material lignocelulósico e solo, quando adaptados, são capazes de degradar o DB22.

As amostras de solo e resíduos lignocelulósicos, coletadas nas regiões indicadas na Seção 4.2 deste estudo, foram boas fontes de microrganismos degradadores do cromóforo azo. O consórcio obtido era capaz de descolorir completamente o DB22 ( $32,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) do meio de cultura em um período de até 12 h. Foram selecionadas bactérias com tolerância a elevadas concentrações de sais, predominantemente gram-positivas (84,0%) e com metabolismo respiratório anaeróbico ou fermentativo (64,8%). Gêneros semelhantes a *Enterococcus* (53,9%), *Streptomyces* (21,6%), *Coxiella* (5,2%) e *Lactobacillus* (4,4%) foram identificados. *Enterococcus* e *Lactobacillus* foram previamente associados à produção de enzimas azoredutases, em estudos da literatura científica, e *Streptomyces* é potencial produtor de enzimas do completo ligninolítico. Estas últimas podem mediar a degradação do azo e de compostos aromáticos produzidos no processo de descoloração reductiva. Com isto, **a Hipótese A provou-se acertada.**

**Hipótese B:** A aeração intermitente e concentração inicial de co-substrato exercem pressões seletivas na comunidade de microrganismos.

Observou-se que a concentração inicial de co-substrato na AR e o nível de aeração intermitente exercem pressões seletivas sobre as populações de bactérias. No inóculo, predominaram membros dos filos *Firmicutes* (61,3%), *Actinobacteria* (21,7%), *Proteobacteria* (14,5%) e *Bacteroidetes* (1,4%). Nos ensaios identificados como E-02 (1  $\text{g.L}^{-1}$  glicose; 4  $\text{h.d}^{-1}$  aeração intermitente) e E-04 (2  $\text{g.L}^{-1}$  glicose; 0  $\text{h.d}^{-1}$  aeração intermitente) – condições experimentais em que houve caracterização microbiana por sequenciamento –, *Proteobacteria* aumentou a sua proporção relativa para 74,1 e 44,6%, respectivamente. *Firmicutes* e *Actinobacteria*, por outro lado, diminuíram suas abundâncias relativas. Neste sentido, **a Hipótese B mostrou-se correta.**

**Hipótese C:** Consórcios microbianos mais diversos são mais eficientes em degradar o DB22 da AR.

Os valores do índice de Shannon foram inferiores nos ensaios em que foi que foi utilizada a concentração de glicose de 1  $\text{g.L}^{-1}$  ou tempo de aeração de 8  $\text{h.d}^{-1}$ . Estes

ensaios também foram responsáveis por menores eficiências de remoção de cor, sugerindo que a competição por doadores de elétrons pode ter limitado a diversidade de populações na amostra e, portanto, a descoloração reductiva do azo. Os ensaios com maior diversidade microbiana, por outro lado, apresentaram maiores eficiências de descoloração. Neste sentido, **a Hipótese C mostrou-se correta.**

**Hipótese D:** A concentração inicial de co-substrato e aeração intermitente são fatores que influenciam a remoção de cor e de matéria orgânica da AR têxtil simulada contendo o DB22.

Observou-se que a descoloração ( $Y_1$ ) é afetada pela concentração inicial de glicose ( $X_1$ ) na AR e pelo tempo de aeração intermitente ( $X_2$ ). Isto ocorre porque o co-substrato é utilizado como fonte de equivalentes de redução para a degradação do cromóforo azo. Concomitantemente, a transferência desses elétrons ao corante ocorre na ausência de oxigênio, que é um aceptor de elétrons mais eficiente ao azo. Neste sentido,  $X_1$  e  $X_2$  afetam a resposta de maneira positiva e negativa, nesta ordem. Ademais, os impactos de  $X_2$  sobre  $Y_1$  são mais significativos, comparado a  $X_1$ , e não há interação entre os efeitos desses fatores. Os maiores valores de descoloração média foram de 90 e 91%, obtidos para as condições identificadas como E-04 (2 g.L<sup>-1</sup> glicose; 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente) e E-08 (3 g.L<sup>-1</sup> glicose; 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente).

Quando a variável dependente investigada é K, notou-se que o efeito sinérgico entre  $X_1$  e  $X_2$  se torna expressivo. Isto não é notado no longo prazo, i.e. na investigação da descoloração após 120 h. Em suma, observa-se que K aumenta com o aumento da concentração de glicose, até 2 g.L<sup>-1</sup>, e decresce linearmente com o aumento dos ciclos de aeração (0 – 8 h.d<sup>-1</sup>). A maior média de K foi de 2,18 d<sup>-1</sup>, observada nos ensaios não-aerados e com concentrações de glicose de 2 e 3 g.L<sup>-1</sup>.

Ademais, constatou-se que a aeração intermitente tem forte impacto positivo sobre a remoção de DQO, embora os efeitos da concentração de co-substrato também tenham sido significativos. Isto pode ser atribuído à degradação da matéria orgânica pela via respiratória aeróbia, que é mais eficiente energeticamente. A maior média de remoção de DQO foi de 825 mg.L<sup>-1</sup>, após 120 h, obtida no experimento E-09 (3 g.L<sup>-1</sup> glicose; 4 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente).

Diante dos fatos supracitados, **a Hipótese D foi aceita.**

**Hipótese E:** O consórcio microbiano é capaz de degradar o corante azo inclusive na presença de oxigênio.

A aeração intermitente interferiu de forma negativa na remoção de cor da AR. No ensaio E-02 (1 g.L<sup>-1</sup> glicose, 4 h.d<sup>-1</sup> aeração), observou-se predominância de *Klebsiella* (54,4%) ao final do experimento, sendo este um dos poucos gêneros capazes de reduzir o azo na presença de oxigênio. A eficiência de descoloração média neste ensaio, no entanto, foi de apenas 61,9%. Ademais, nos ensaios com aeração intermitente, observou-se que o processo de descoloração foi interrompido durante os intervalos aerados. **A Hipótese E, portanto, foi refutada.**

**Hipótese F:** A concentração inicial de co-substrato e aeração intermitente são fatores que influenciam o grau de mineralização do DB22.

Nas condições não-aeradas, observou-se que o desaparecimento do pico no intervalo visível, responsável pela cor, precedeu um aumento da área sob a curva de absorção no intervalo de 200-350 nm. Esta faixa está associada à presença de subprodutos da descoloração do DB22. Ademais, nos ensaios identificados como E-04 (2 g.L<sup>-1</sup> glicose; 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente) e E-07 (2 g.L<sup>-1</sup> glicose; 0 h.d<sup>-1</sup> aeração intermitente), verificou-se a formação de picos bem definidos nos comprimentos de onda de 215 e 255 nm. No nível intermediário de aeração (4 h.d<sup>-1</sup>), houve redução da absorbância na região correspondente ao UV, em relação à condição inicial (t=0), somente para a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose; sugerindo que houve melhor biodegradação do corante nessa condição. O perfil espectral UV permaneceu constante para as concentrações de 2 e 3 g.L<sup>-1</sup>. Inference-se, portanto, que o grau de mineralização do DB22 aumenta com o aumento da frequência de aeração e redução da concentração inicial do co-substrato, **mostrando que a Hipótese F está correta.**

**Hipótese G:** A aplicação de aeração intermitente permite maior remoção de ecotoxicidade da AR.

Os ensaios ecotoxicológicos demonstraram que não houve redução da ecotoxicidade aguda às sementes de *L. sativa* em nenhuma condição experimental testada. Os valores de GR nas amostras tratadas não diferiram estatisticamente, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (95% de probabilidade), em relação às condições iniciais. Nos ensaios com maior número de sementes, conduzidos somente para as amostras de AR sem-tratamento e tratadas nas condições E-02 e E-04, a ANOVA

apontou que não houve diferença estatística entre as médias de GR, a 95% de probabilidade.

Nos testes com os neonatos de *D. magna*, observou-se que houve menor mortalidade e/ou imobilidade em E-02. O valor estimado da  $CE_{50}$  foi de  $77\pm 2\%$  para a condição E-02, ante a um valor de  $26\pm 1\%$  calculado para amostras do ensaio E-04. Este fato pode ser atribuído à biodegradação de subprodutos da descoloração do DB22 e à melhor remoção de DQO nos ensaios com aeração intermitente intermediária.

Neste sentido, **a Hipótese G mostra-se parcialmente correta.**

## 7. CONCLUSÕES

- O consórcio microbiano obtido a partir do enriquecimento da biomassa provinda de material colhido em florestas tropicais foi eficiente na degradação do corante azo. Confirmou-se que as florestas tropicais podem se constituir em fontes de microrganismos capazes de degradar essa classe de compostos.
- A aeração intermitente e a concentração inicial de glicose exerceram pressões seletivas sobre as comunidades de bactérias;
- A diversidade microbiana aumentou a eficiência de descoloração do corante azo em processo com utilização de aeração intermitente, o que deve estar relacionado à interação sinérgica entre enzimas específicas, e.g. azoredutases, e oxido-redutases não-específicas produzidas por diversas populações de bactérias;
- A concentração inicial de glicose afetou positivamente a descoloração do DB22 no longo prazo, a constante de descoloração e a remoção de DQO da AR;
- A aeração intermitente teve impacto negativo sobre a descoloração no longo prazo e constante de descoloração, enquanto seus efeitos sobre a remoção de DQO foram positivos;
- Nos reatores de batelada submetidos à aeração intermitente, foram necessários maiores tempos para que se pudesse alcançar eficiências de descoloração similares à dos reatores não-aerados;
- A utilização de aeração intermitente aumentou o grau de mineralização do DB22 da AR têxtil sintética;
- A aplicação de aeração intermitente não removeu ecotoxicidade a sementes de *L. sativa*, mas produziu um efluente menos tóxico à *D. magna*, que é um bioindicador mais sensível.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.
- Adnan, L.A., Sathishkumar, P., Mohd Yusoff, A.R., Hadibarata, T., 2015. Metabolites characterisation of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F03. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 104, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.019>
- Almeida, E., Almeida, R. De, Corso, C.R., 2016. Acid Blue 161 : Decolorization and Toxicity Analysis After Microbiological Treatment. **Water, Air, Soil Pollut.** <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3042-5>
- Amaral, F.M., Florêncio, L., Kato, M.T., Santa-Cruz, P.A., Gavazza, S., 2017. Hydraulic retention time influence on azo dye and sulfate removal during the sequential anaerobic-aerobic treatment of real textile wastewater. **Water Sci. Technol.** 76, 3319–3327. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.378>
- Amaral, F.M., Kato, M.T., Florêncio, L., Gavazza, S., 2014. Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresour. Technol.** 163, 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.026>
- Amorim, S.M., Kato, M.T., Florencio, L., Gavazza, S., 2013. Influence of redox mediators and electron donors on the anaerobic removal of color and chemical oxygen demand from textile effluent. **Clean - Soil, Air, Water** 41, 928–933. <https://doi.org/10.1002/clen.201200070>
- APHA/AWWA/WEF., 2005. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st ed, APHA, American Public Health Association. American Public Health Association, Washington D.C., USA.
- Bafana, A., Chakrabarti, T., Krishnamurthi, K., Devi, S.S., 2008. Biodiversity and dye decolourization ability of an acclimatized textile sludge. **Bioresour. Technol.** 99, 5094–5098. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.074>
- Bandounas, L., Wierckx, N.J., de Winde, J.H., Ruijssenaars, H.J., 2011. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. **BMC Biotechnol.** 11, 94. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-94>
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Benomar, S., Ranava, D., Cárdenas, M.L., Trably, E., Rafrafi, Y., Ducret, A., Hamelin, J., Lojou, E., Steyer, J., Giudici-Ortoni, M.-T., 2015. Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species. **Nat. Commun.** 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7283>
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds . Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 4627–4632.



- Box, G.E.P., Wetz, J., 1973. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximating response function**. Technical Report n. 995.
- Brasil. **Lei Federal nº. 6.938** de 31 de Agosto de 1981: Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente. 1981.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. **CONAMA nº430**. Resolução nº430, de 13 de Maio de 2011.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. **CONAMA nº357**. Resolução nº 357 de 18 de março de 2005.
- Braúna, C.H.D.C., Mota, S., Santos, A.B., 2009. Descoloração redutiva do corante azo RR2 na ausência e presença de mediador redox e acceptor de elétrons nitrato. **Eng. Sanit. e Ambient.** 14, 275–284. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522009000200015>
- Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. **Trends Biotechnol.** 26, 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. Enterococci in the Environment. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 76, 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- Chang, J.S., Chou, C., Lin, Y.C., Lin, P.J., Ho, J.Y., Lee Hu, T., 2001. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Res.** 35, 2841–2850. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00581-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00581-9)
- Chao, A., Lee, S.M., 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. **J. Am. Stat. Assoc.** 87, 210–217. <https://doi.org/10.1080/01621459.1992.10475194>
- Chen, H., Wang, R.F., Cerniglia, C.E., 2004. Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*. **Protein Expr. Purif.** 34, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.12.016>
- Chen, H., Xu, H., Heinze, T.M., Cerniglia, C.E., 2009. Decolorization of water and oil-soluble azo dyes by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus fermentum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36, 1459–1466. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0633-9>
- Christie, R.M., 2015. Colour Chemistry, 2nd ed, Color Research and Application. **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, UK.
- Chung, K.T., Stevens, S.E., 1993. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and hel- minths. **Environ. Toxicol. Chem.** 12, 2121–2132. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(92\)90127-V](https://doi.org/10.1016/0269-7491(92)90127-V)
- Chung, K.T., Stevens, S.E., Cerniglia, C.E., 1992. The Reduction of Azo Dyes by the Intestinal Microflora. **Crit. Rev. Microbiol.** 18, 175–190. <https://doi.org/10.3109/10408419209114557>
- Cui, D., Li, G., Zhao, D., Gu, X., Wang, C., Zhao, M., 2012. Microbial community structures in mixed bacterial consortia for azo dye treatment under aerobic and anaerobic conditions. **J. Hazard. Mater.** 221–222, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.032>
- Dafale, N., Agrawal, L., Kapley, A., Meshram, S., Purohit, H., Wate, S., 2010. Selection of indicator bacteria based on screening of 16S rDNA metagenomic library from a two-stage

- anoxic-oxic bioreactor system degrading azo dyes. **Bioresour. Technol.** 101, 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.006>
- Dai, R., Chen, X., Xiang, X., Wang, Y., Wang, F., 2018. Understanding azo dye anaerobic biodecolorization with artificial redox mediator supplement: Considering the methane production. **Bioresour. Technol.** 249, 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.072>
- Desjardins, P.R., Conklin, D.S., 2011. Microvolume quantitation of nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 1–4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03js93>
- Dilallo, R., Albertson, O.E., 1961. Volatile Acids by Direct Titration. **J. Water Pollut. Control. Fed.** 33, 356–365.
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., van Lier, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresour. Technol.** 98, 2369–2385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.013>
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., 2004. 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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64, 62–69. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1428-y>
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., Yaya-Beas, R.E., Van Lier, J.B., 2003. Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. **Enzyme Microb. Technol.** 33, 942–951. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.07.007>
- Dos Santos, A.B., Traverse, J., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., 2005. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. **Biotechnol. Bioeng.** 89, 42–52. <https://doi.org/10.1002/bit.20308>
- Elbanna, K., Hassan, G., Khider, M., Mandour, R., 2010. Safe Biodegradation of Textile Azo Dyes by Newly Isolated Lactic Acid Bacteria and Detection of Plasmids Associated With Degradation. **J. Bioremediation Biodegrad.** 01, 1–6. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000112>
- Environment Canada, 2007. **Biological Test Method : Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to daphnia magna**. 2. ed. Environmental Technology Centre, Ottawa, Canada.
- EPA, 1997. **Profile of the Textile Industry**. Environmental Protection Agency, Washington, USA.
- EPA, 1989. **Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites**. Environmental Protection Agency, Corvallis, USA.
- Ferraz, A.D.N., Kato, M.T., Florencio, L., Gavazza, S., 2011. Textile effluent treatment in a UASB reactor followed by submerged aerated biofiltration. **Water Sci. Technol.** 64, 1581–1589. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.674>
- Firmino, P.I.M., da Silva, M.E.R., Cervantes, F.J., dos Santos, A.B., 2010. Colour removal of dyes from synthetic and real textile wastewaters in one- and two-stage anaerobic systems. **Bioresour. Technol.** 101, 7773–7779. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.050>

- Forgacs, E., Cserhádi, T., Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. **Environ. Int.** 30, 953–971. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.001>
- Forss, J., Pinhassi, J., Lindh, M., Welander, U., 2013. Microbial diversity in a continuous system based on rice husks for biodegradation of the azo dyes Reactive Red 2 and Reactive Black 5. **Bioresour. Technol.** 130, 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.097>
- Franciscon, E., Andrea, Z., Fabio, D.G., de Menezes Cristiano, R., Regina, D.L., Artur, C.P., 2009a. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 63, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.10.003>
- Franciscon, E., Zille, A., Fantinatti-Garboggini, F., Silva, I.S., Cavaco-Paulo, A., Durrant, L.R., 2009b. Microaerophilic-aerobic sequential decolourization/biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Klebsiella* sp. strain VN-31. **Process Biochem.** 44, 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.009>
- Franco, M.S., Azevedo, E.B., 2014. Color removal of Remazol dye baths wastewater by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> does not decrease TOC, BOD/COD, and toxicity of the effluent. **Desalin. Water Treat.** 52, 1600–1607. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.789808>
- Frota, I.L.N., Lima, J.P.R., Melo, A.S.S. de A., 2014. Os Incentivos Fiscais do Governo do Estado de Pernambuco para Atração de Empresas: Um Caso de Sucesso?. **Rev. Econ. NE. Fortaleza**, v. 45, n. 4, p. 67-82 .
- Galai, S., Limam, F., Marzouki, M.N., 2009. A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. use in decolorization of synthetic dyes. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 158, 416–431. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8369-y>
- Gavazza, S., Guzman, J.J.L., Angenent, L.T., 2015. Electrolysis within anaerobic bioreactors stimulates breakdown of toxic products from azo dye treatment. **Biodegradation** 26, 151–160. <https://doi.org/10.1007/s10532-015-9723-8>
- Gibson, S.I., 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. **J. Exp. Bot.** 55, 253–264. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh048>
- Good, I.J., 1953. The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. **Biometrika**. 40, 237. <https://doi.org/10.2307/2333344>
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontol. Electron.** 4 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.02>
- Harane, R.S., Adivarekar, R. V., 2016. Sustainable processes for pre-treatment of cotton fabric. **Text. Cloth. Sustain.** 2, 2. <https://doi.org/10.1186/s40689-016-0012-7>
- Harigaya, W., Takahashi, H., 2018. Effects of glucose and ethylene on root hair initiation and elongation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. **J. Plant Res.** 131, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-1003-8>
- Hawking, S., 1988. **A Brief History of Time**. Bantam Dell Publishing Group, New York.
- Hollander, D.H., Nell, E.E., Hollander, D.H., Nell, E.E., 1954. Improved Preservation of *Treponema pallidum* and Other Bacteria by Freezing with Glycerol. **App. Microbiol.** 164–170.

- Hsueh, C.C., Chen, B.Y., 2007. Comparative study on reaction selectivity of azo dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **J. Hazard. Mater.** 141, 842–849. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.056>
- Huang, X.F., Santhanam, N., Badri, D. V., Hunter, W.J., Manter, D.K., Decker, S.R., Vivanco, J.M., Reardon, K.F., 2013. Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. **Biotechnol. Bioeng.** 110, 1616–1626. <https://doi.org/10.1002/bit.24833>
- IBGE, 2015. **Pesquisa Industrial Anual - Empresa**. Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística. Rio de Janeiro, Brasil.
- Imran, M., Arshad, M., Negm, F., Khalid, A., Shaharoon, B., Hussain, S., Mahmood Nadeem, S., Crowley, D.E., 2016. Yeast extract promotes decolorization of azo dyes by stimulating azoreductase activity in *Shewanella* sp. strain IFN4. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 124, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.041>
- INETI, 2000. **Guia técnico: Sector Têxtil, Sites The Journal of 20th Century Contemporary French Studies**. Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. Lisboa, Portugal.
- Işık, M., Sponza, D.T., 2004. Decolorization of Azo Dyes Under Batch Anaerobic and Sequential Anaerobic/Aerobic Conditions. **J. Environ. Sci. Heal.** Part A 39, 1107–1127. <https://doi.org/10.1081/ESE-120028417>
- ISTOÉ, 2017. **Governo de São Paulo zera ICMS para indústria têxtil**. ISTOÉ.
- Jadhav, J.P., Phugare, S.S., Dhanve, R.S., Jadhav, S.B., 2010. Rapid biodegradation and decolorization of Direct Orange 39 (Orange TGLL) by an isolated bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain BCH. **Biodegradation** 21, 453–463. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9315-6>
- Jones, B., Nachtsheim, C.J., 2011. A class of three-level designs for definitive screening in the presence of second-order effects. **J. Qual. Technol.** 43, 1–15. <https://doi.org/10.1080/00224065.2011.11917841>
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S., Chimni, S.S., 2005. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. **Dye. Pigment.** 67, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2004.10.008>
- Khlifi, R., Belbahri, L., Woodward, S., Ellouz, M., Dhoub, A., Sayadi, S., Mechichi, T., 2010. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. **J. Hazard. Mater.** 175, 802–808. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.079>
- Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C., 2007. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. **Curr. Opin. Biotechnol.** 18, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.001>
- Konopka, A., Knight, D., Turco, R.F., 1989. Characterization of a *Pseudomonas* sp. capable of aniline degradation in the presence of secondary carbon sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 55, 385–389.
- Kues, U., 2015. Fungal enzymes for environmental management. **Curr. Opin. Biotechnol.** 33, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006>
- Kunz, A., Peralta-Zamora, P., De Moraes, S.G., Durán, N., 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quim. Nova** 25, 78–82. <https://doi.org/10.1590/S0100->

40422002000100014

- Kurade, M.B., Waghmode, T.R., Patil, S.M., Jeon, B.H., Govindwar, S.P., 2017. Monitoring the gradual biodegradation of dyes in a simulated textile effluent and development of a novel triple layered fixed bed reactor using a bacterium-yeast consortium. **Chem. Eng. J.** 307, 1026–1036. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.028>
- Lemos, L.N., Fulthorpe, R.R., Triplett, E.W., Roesch, L.F.W., 2011. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **J. Microbiol. Methods** 86, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.014>
- Leung, P.-C., Pointing, S.B., 2002. Effect of different carbon and nitrogen regimes on Poly R decolorization by white-rot fungi. **Mycol. Res.** 106, 86–92. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1017/S09533756201005202>
- Levenspiel, O., 1998. **Chemical Reaction Engineering, Chemical Reaction Engineering.** [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(80\)80132-1](https://doi.org/10.1016/0009-2509(80)80132-1)
- Lima, U.A.L. et al. **Biotecnologia Industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos - Vol. 3.** Editora Edgard Blucher, 2001.
- Liu, Z., Yang, H., Huang, Z., Zhou, P., Liu, S.J., 2002. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58, 679–682. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0933-8>
- Lumbaqué, E.C., Gomes, M.F., Da, V., Carvalho, S., Freitas, A.M. De, Regina, E., Tiburtius, L., 2017. Degradation and ecotoxicity of dye Reactive Black 5 after reductive-oxidative process **Environmental Science and Pollution Research** 6126–6134. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7150-y>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2014. **Brock Biology of Microorganisms**, Igarss 2014. Pearson.
- Magurran, A.E., 1983. *Ecological Diversity and Its Measurement*.
- Mazzoli, R., Pessione, E., Giuffrida, M.G., Fattori, P., Barello, C., Giunta, C., Lindley, N.D., 2007. Degradation of aromatic compounds by *Acinetobacter radioresistens* S13: Growth characteristics on single substrates and mixtures. **Arch. Microbiol.** 188, 55–68. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0223-z>
- Menezes, O.L.M.P.F. **Influência da microaeração descontínua sobre a remoção de cor e matéria orgânica de efluentes contendo corante azo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2016.
- Misal, S.A., Lingojar, D.P., Lokhande, M.N., Lokhande, P.D., Gawai, K.R., 2014. Enzymatic transformation of nitro-aromatic compounds by a flavin-free NADH azoreductase from *Lysinibacillus sphaericus*. **Biotechnol. Lett.** 36, 127–131. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1338-8>
- Muyzer, G.A., Waal, E.C. De, Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59, 695–700.
- Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., 2010. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria.** 4. ed. Porto Alegre: Bookman Editora.

- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriol.** 178, 5636–5643.
- Pandey, A., Singh, P., Iyengar, L., 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 59, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.08.006>
- Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L., Crawford, R.L., 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 3605–3613.
- Pasti-Grigsby, M.B., Crawford, D.L., 1991. Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade lignocellulose. **Can. J. Microbiol.** 37, 902–907. <https://doi.org/10.3402/iee.v4.21528>
- Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., Crawford, R.L., Crawford, D.L., 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 3598–3604.
- Paszczynski, A., Pasti, M.B., Goszczynski, S., Crawford, D.L., Crawford, R.L., 1991. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme Microb. Technol.** 13, 378–384. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90198-J](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90198-J)
- Peet, R.K., 1974. The Measurement of Species Diversity. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 5, 285–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.05.110174.001441>
- Phugare, S.S., Kalyani, D.C., Surwase, S.N., Jadhav, J.P., 2011. Ecofriendly degradation, decolorization and detoxification of textile effluent by a developed bacterial consortium. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 74, 1288–1296. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.003>
- Pinheiro, H.M., Touraud, E., Thomas, O., 2004. Aromatic amines from azo dye reduction: Status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dye. Pigment.** 61, 121–139. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2003.10.009>
- Priac, A., Badot, P., 2017. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa* : Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies.** 340, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.01.002>
- Rau, J., Stolz, A., 2003. Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as Lawsone-dependent azo reductases. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 3448–3455. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3448-3455.2003>
- Ripley, L.E., Boyle, W.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **J. Water Pollut. Control. Fed.** 58, 406–411.
- Rodrigues, M.I., Lemma, A.F., 2014. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, 3a ed. Cárita Editora, Campinas, SP.
- Roriz, M.S., Osma, J.F., Teixeira, J.A., Rodríguez Couto, S., 2009. Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. **J. Hazard. Mater.** 169, 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.150>
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van

- der Lelie, D., Dow, J.M., 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nat. Rev. Microbiol.** 7, 514–525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Santos, A.B. dos, 2001. Aplicação conjunta de tratamento anaeróbio termofílico por lodo granular e de mediadores redox na remoção de cor de águas residuárias têxteis. **Eng. Sanit. e Ambient.** 10, 253–259. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522005000300010>
- Saratale, R.G., Gandhi, S.S., Purankar, M. V., Kurade, M.B., Govindwar, S.P., Oh, S.E., Saratale, G.D., 2013. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye C.I. Remazol Red and textile effluent by isolated *Lysinibacillus* sp. RGS. **J. Biosci. Bioeng.** 115, 658–667. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.009>
- Scheline, R.R., Nygaard, R.T., Longberg, B., 1970. Enzymatic reduction of the azo dye, acid yellow, by extracts of *Streptococcus faecalis* isolated from rat intestine. **Food Cosmet. Toxicol.** 8, 55–58. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(70\)80223-1](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(70)80223-1)
- Seesuriyachan, P., Takenaka, S., Kuntiya, A., Klayraung, S., Murakami, S., Aoki, K., 2007. Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. **Water Res.** 41, 985–992. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.001>
- Sen, S.K., Raut, S., Bandyopadhyay, P., Raut, S., 2016. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. **Fungal Biol. Rev.** 30, 112–133. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.003>
- Senan, R.C., Abraham, T.E., 2004. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **Biodegradation** 15, 275–280. <https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000043000.18427.0a>
- Sharma, S.C.D., Sun, Q., Li, J., Wang, Y., Suanon, F., Yang, J., Yu, C.P., 2016. Decolorization of azo dye methyl red by suspended and co-immobilized bacterial cells with mediators anthraquinone-2,6-disulfonate and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 112, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.035>
- Shaul, G.M., Holdsworth, T.J., Dempsey, C.R., Dostal, K.A., 1991. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere** 22, 107–119. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(91\)90269-J](https://doi.org/10.1016/0045-6535(91)90269-J)
- Silva, A., Faleiro, G., Cristina, M., Cordeiro, R., Karia, C.T., 2003. Metodologia para operanizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando análises moleculares. Embrapa 1–5.
- Singh, R.L., Singh, P.K., Singh, R.P., 2015. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review. **Int. Biodeterior. Biodegradation** 104, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.027>
- Solanki, K., Subramanian, S., Basu, S., 2013. Microbial fuel cells for azo dye treatment with electricity generation: A review. **Bioresour. Technol.** 131, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.063>
- Stams, A.J.M., Plugge, C.M., 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nat. Rev. Microbiol.** 7, 568–577. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2166>
- Talarposhti, A.M., Donnelly, T., Anderson, G.K., 2001. Colour removal from a simulated dye

- wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. **Water Res.** 35, 425–432. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00280-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00280-3)
- Tan, L., He, M., Song, L., Fu, X., Shi, S., 2016. Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. **Bioresour. Technol.** 203, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.058>
- Tan, L., Ning, S., Zhang, X., Shi, S., 2013. Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. **Bioresour. Technol.** 138, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.183>
- Telke, A.A., Joshi, S.M., Jadhav, S.U., Tamboli, D.P., Govindwar, S.P., 2010. Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. **Biodegradation** 21, 283–296. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9300-0>
- Thangaraj, K., Kapley, A., Purohit, H.J., 2008. Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds. **Bioresour. Technol.** 99, 2488–2494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.053>
- Van Der Zee, F.P., Bisschops, I.A.E., Blanchard, V.G., Bouwman, R.H.M., Lettinga, G., Field, J.A., 2003. The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. **Water Res.** 37, 3098–3109. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00166-0)
- Wang, R.F., Chen, H., Paine, D.D., Cerniglia, C.E., 2004. Microarray method to monitor 40 intestinal bacterial species in the study of azo dye reduction. **Biosens. Bioelectron.** 20, 699–705. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.04.011>
- Whyte, L.G., Bourbonnière, L., Greer, C.W., 1997. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways†. **Applied and Environmental Microbiol.** 63, 3719–3723.
- Wong, P.K., Yuen, P.Y., 1996. Decolorization and biodegradation of Methyl Red by *Klebsiella Pneumoniae* RS-13. **Water Res.** 30, 1736–1744.
- Wong, Y., Yu, J., 1999. Laccase-Catalyzed Decolorization of Synthetic Dyes. **Water Res.** 33, 3512–3520.
- Wu, J., Eiteman, M.A., Law, S.E., 1998. Evaluation of Membrane Filtration and Ozonation. **J. Environ. Eng.** 124, 272–277.
- Xiao, C., Ning, J., Yan, H., Sun, X., Hu, J., 2009. Biodegradation of Aniline by a Newly Isolated *Delftia* sp. XYJ6. **Chinese J. Chem. Eng.** 17, 500–505. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60237-2](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60237-2)
- Yang, Q., Li, C., Li, H., Li, Y., Yu, N., 2009. Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. **Biochem. Eng. J.** 43, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.002>
- You, S.J., Teng, J.Y., 2009. Anaerobic decolorization bacteria for the treatment of azo dye in a sequential anaerobic and aerobic membrane bioreactor. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.** 40, 500–504. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2009.01.007>
- Yu, L., Li, W.W., Lam, M.H.W., Yu, H.Q., Wu, C., 2012. Isolation and characterization of a

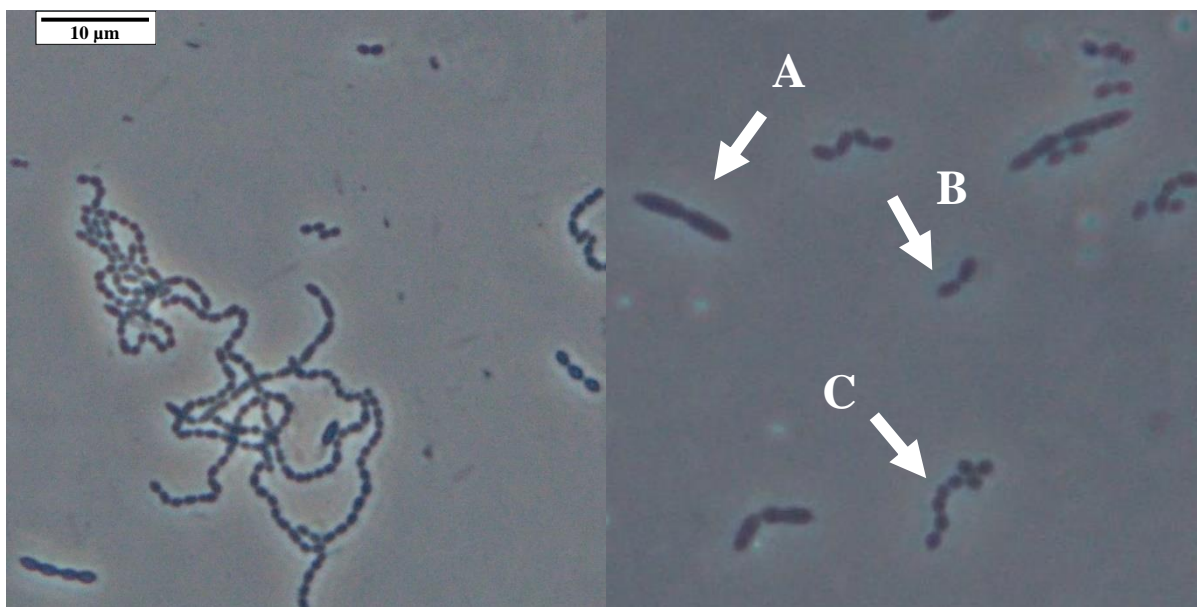


- Klebsiella oxytoca* strain for simultaneous azo-dye anaerobic reduction and bio-hydrogen production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 95, 255–262. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3688-2>
- Zhang, M.M., Chen, W.M., Chen, B.Y., Chang, C.T., Hsueh, C.C., Ding, Y., Lin, K.L., Xu, H., 2010. Comparative study on characteristics of azo dye decolorization by indigenous decolorizers. **Bioresour. Technol.** 101, 2651–2656. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.070>
- Zimmermann, T., Kulla, H.G., Leisinger, T., 1982. Properties of Purified Orange II Azoreductase, the Enzyme Initiating Azo Dye Degradation by *Pseudomonas* KF46. **Eur. J. Biochem.** 129, 197–203.

## APÊNDICE A

Morfologia dos microrganismos do consórcio utilizado como inóculo dos experimentos de batelada.

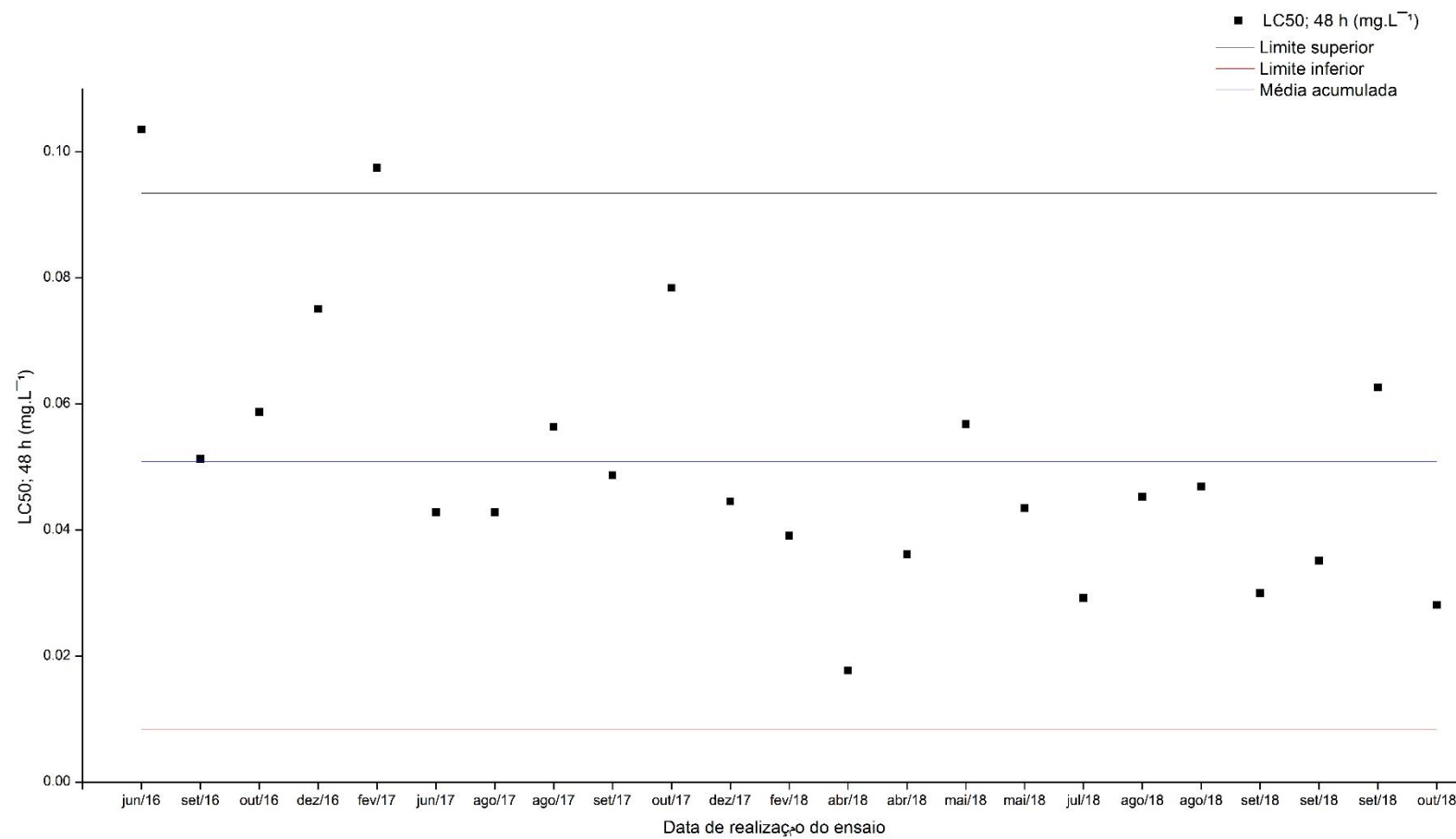
**Figura A.1.** Imagens de microscópio ótico de contraste de fase de consórcio bacteriano preservado em glicerina 50% (v.v<sup>-1</sup>) após reativação em MC por período de 24 h. As fotomicrografias revelam a predominância de bactérias dos tipos bacilo (A), cocobacilo (B) e cocos (C).



## APÊNDICE B

### Carta-control de sensibilidade (*D. magna*)

Figura B.1. Carta-control de sensibilidade de *D. magna* para a substância de referência  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .



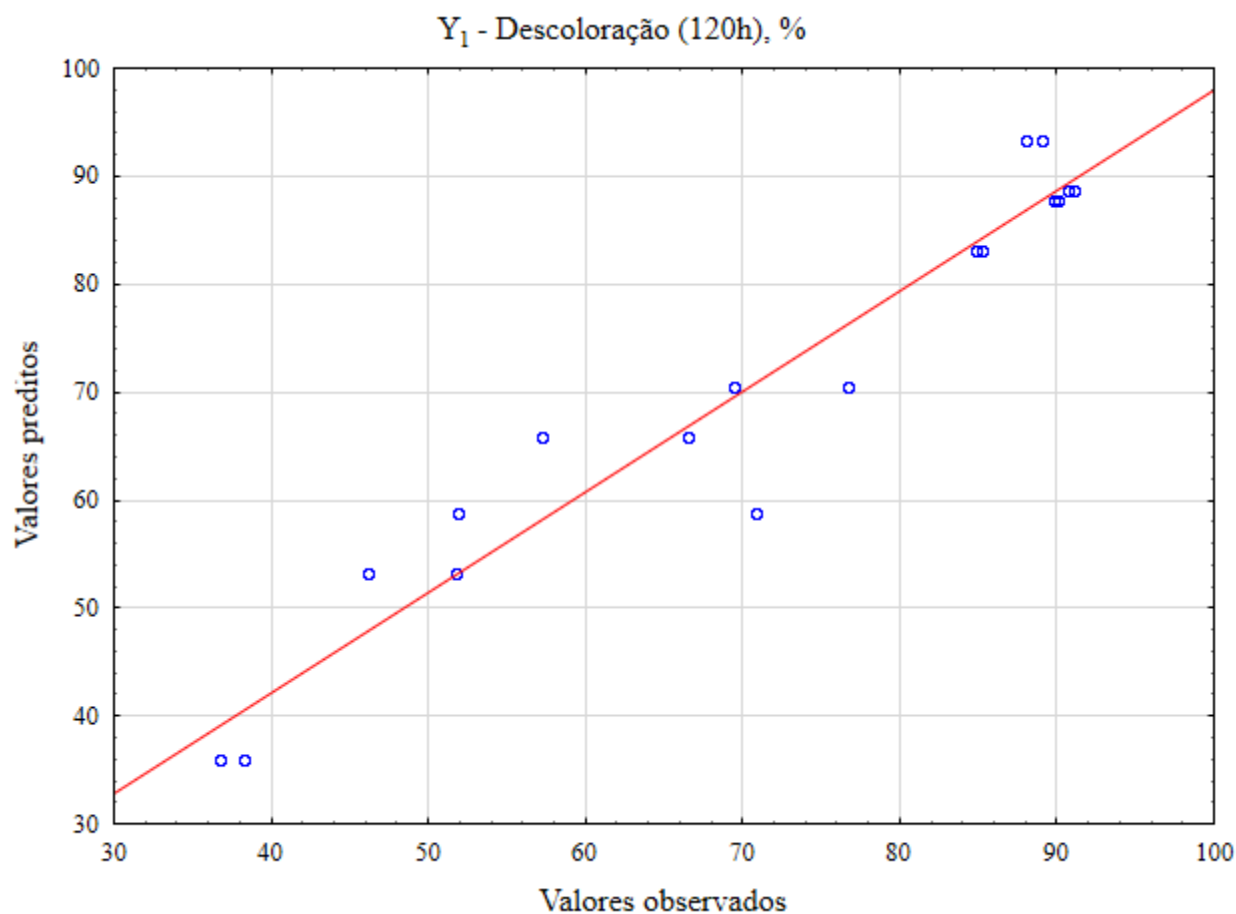
### APÊNDICE C

Testes estatísticos referentes ao planejamento fatorial completo  $3^2$ , com duas repetições, utilizado para avaliar os efeitos individuais e sinérgicos da concentração de glicose ( $X_1$ ) e aeração intermitente ( $X_2$ ) sobre as respostas descoloração ( $Y_1$ ), constante de descoloração ( $Y_2$ ) e remoção de DQO ( $Y_3$ ).

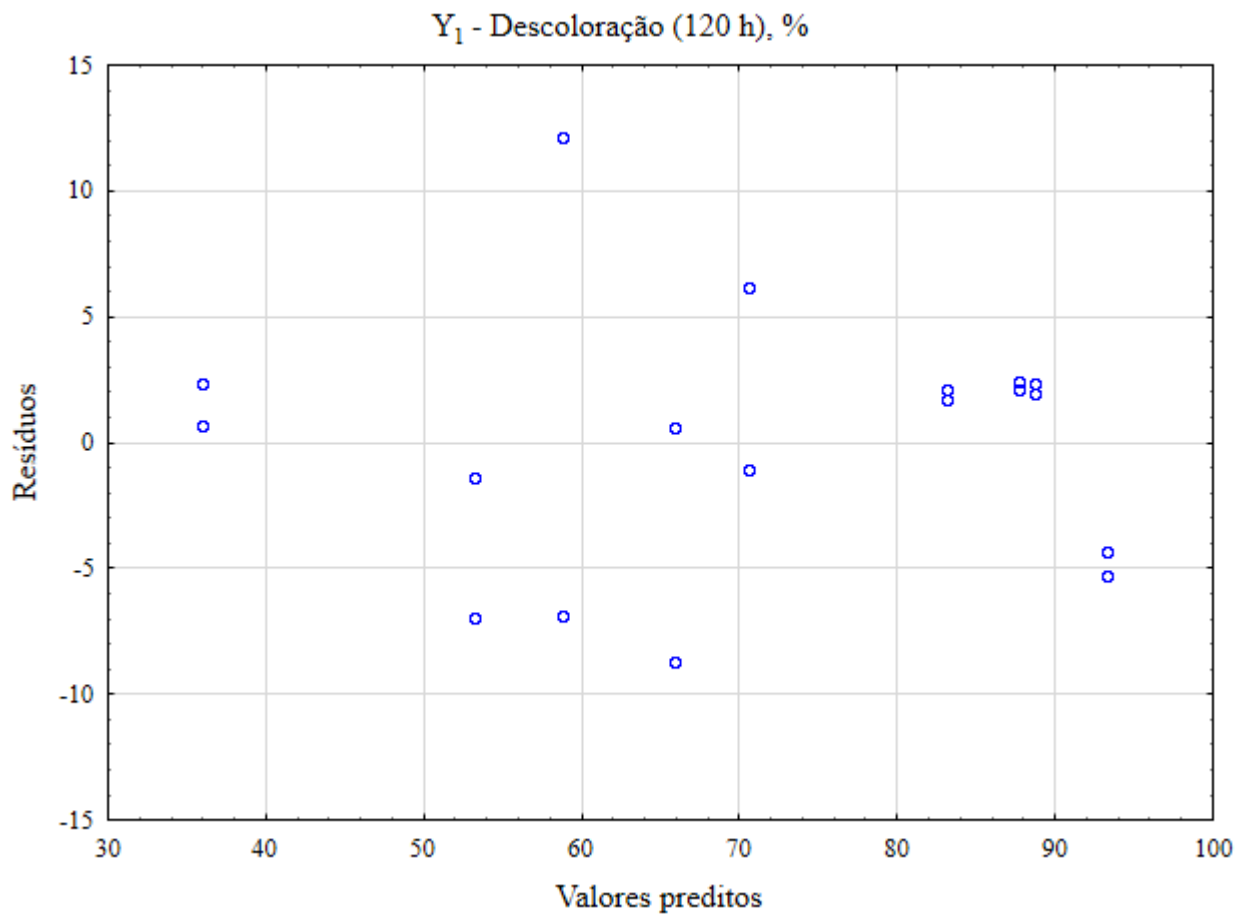
**Tabela C.1.** ANOVA dos fatores para a resposta descoloração ( $Y_1$ ) após 120 h de experimento. Nível de significância de 10%.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	p-valor
$X_1$	1690.6	2	845.3	25.0	<0,0001
$X_2$	4223.7	2	2111.9	62.4	<0,0001
Resíduos	440.0	13	33.8		
Total	6354.4	17			

**Figura C.1.** Gráfico de valores preditos versus observados para a resposta descoloração ( $Y_1$ ) após 120 h de experimento.



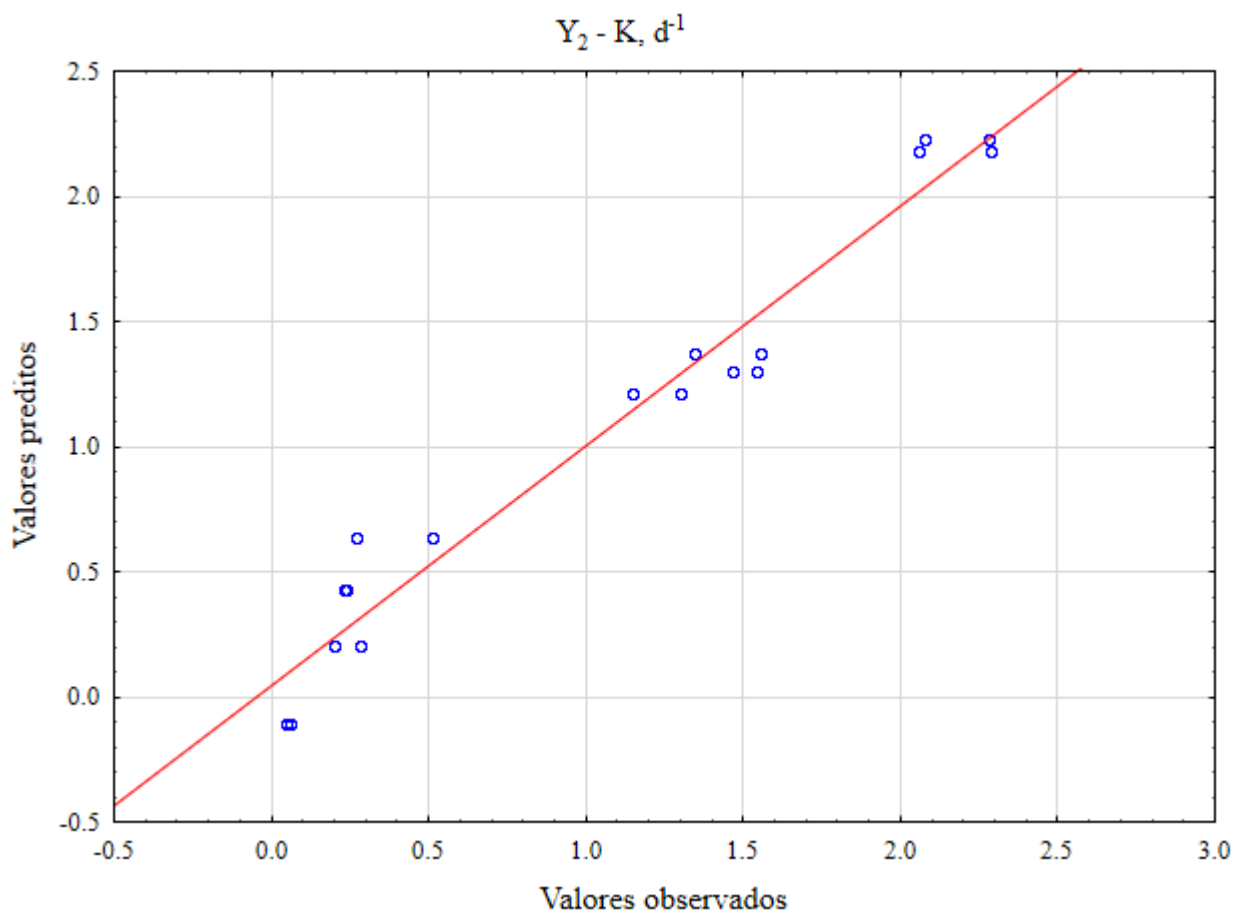
**Figura C.2.** Gráfico dos resíduos deixados pelo ajuste de um modelo quadrático às respostas de descoloração ( $Y_1$ ) obtidas após 120 h de experimento



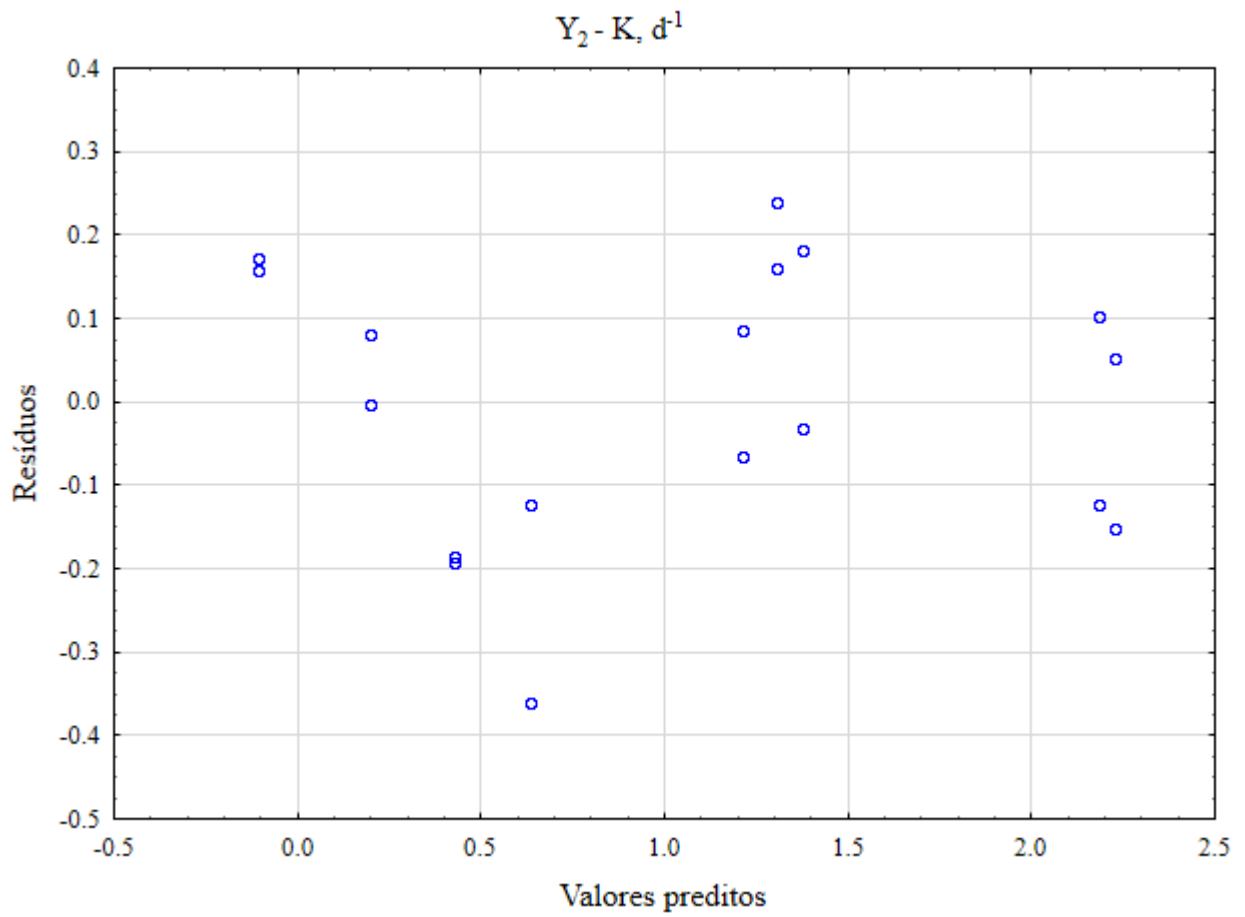
**Tabela C.2.** ANOVA dos fatores para a resposta constante de descoloração ( $Y_2$ ). Nível de significância de 10%.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	$F_{calc}$	p-valor
$X_1$	1.6	2	0.8	22.5	<0,0001
$X_2$	9.3	1	9.3	261.6	<0,0001
$X_1 \cdot X_2$	0.1	1	0.1	4.2	0.0620
Resíduos	0.5	13	0.0		
Total	11.5	17			

**Figura C.3.** Gráfico de valores preditos versus observados para a resposta K ( $Y_2$ ).

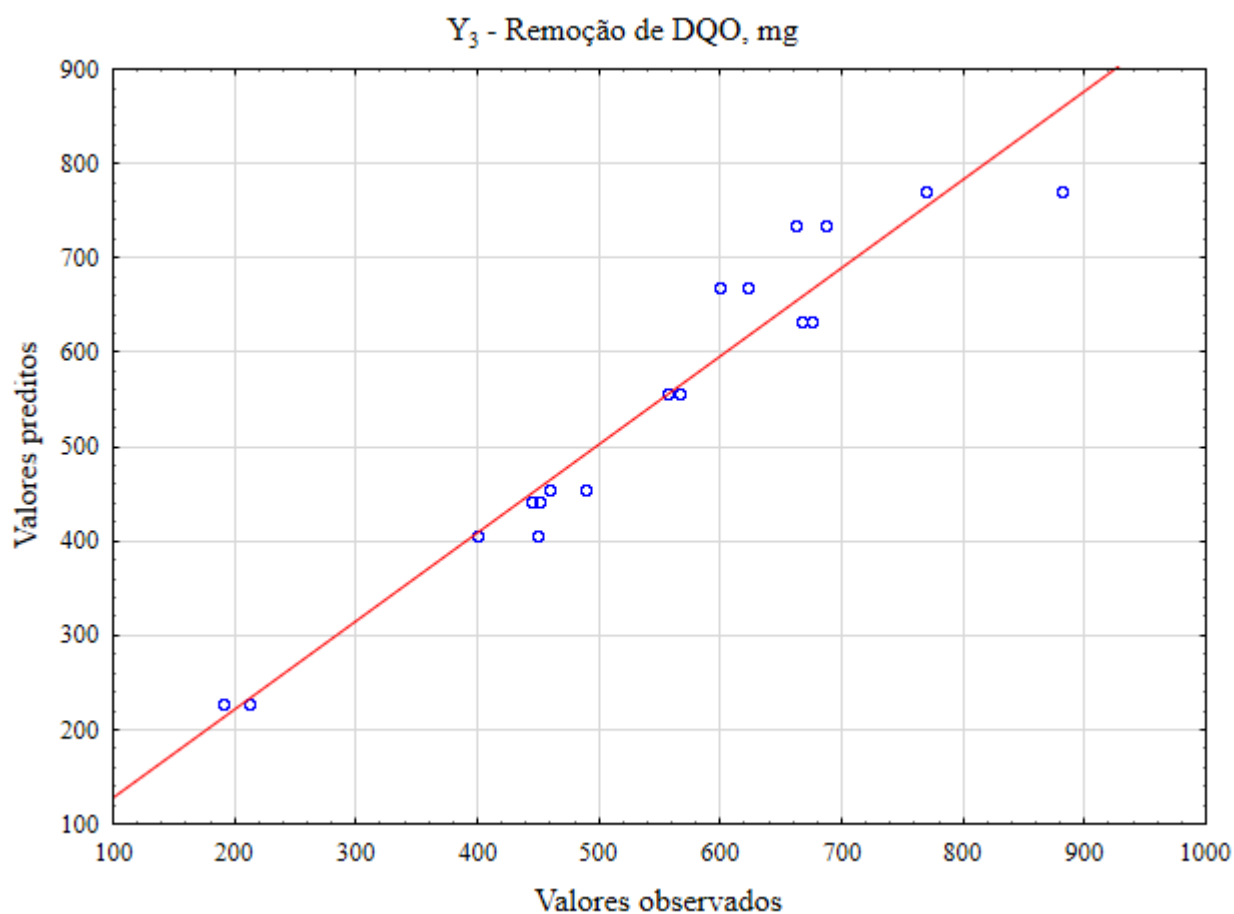


**Figura C.4.** Gráfico dos resíduos deixados pelo ajuste de um modelo quadrático às respostas de K ( $Y_2$ ).



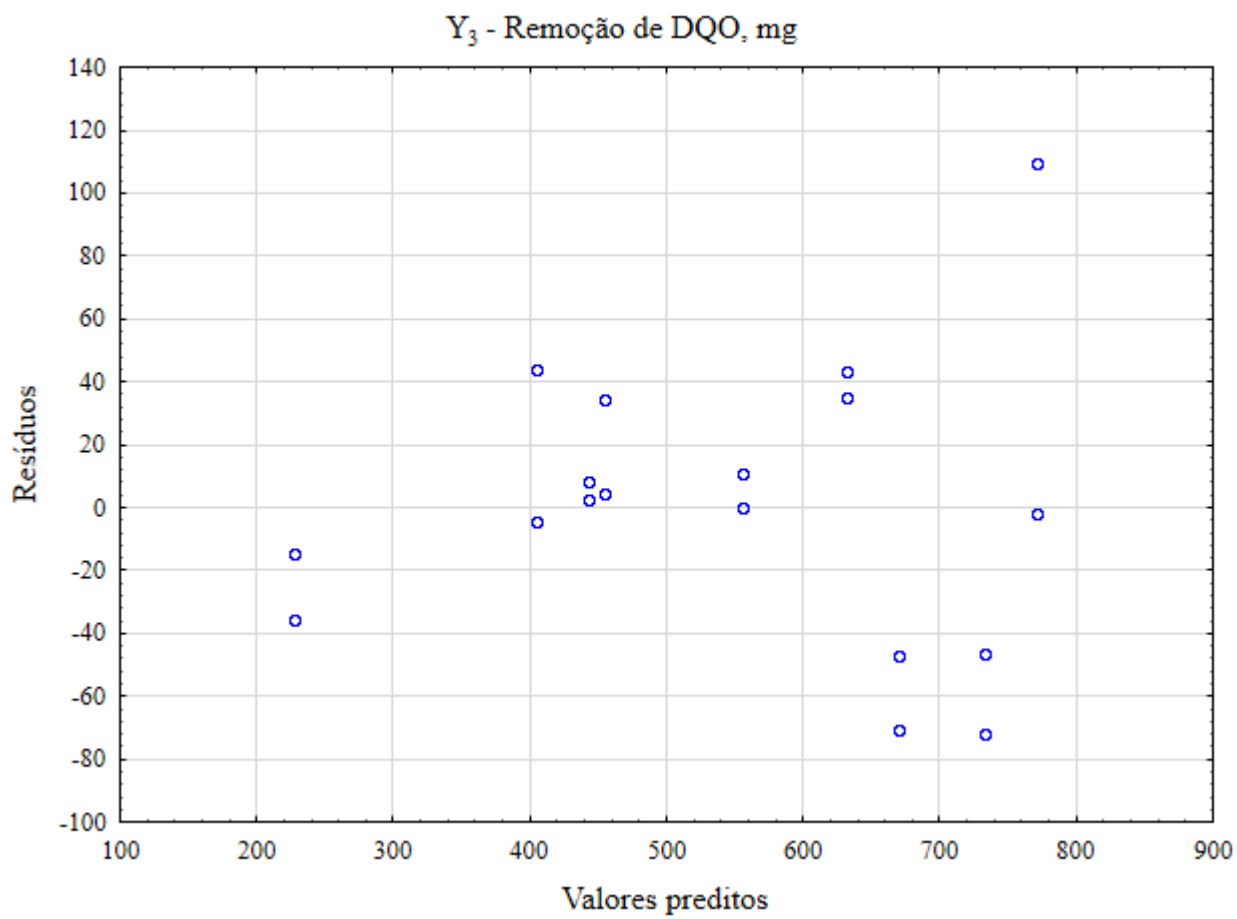
**Tabela C.3.** ANOVA dos fatores para a resposta remoção de DQO ( $Y_3$ ). Nível de significância de 10%.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	$F_{calc}$	p-valor
$X_1$	159129.9	2	79564.9	29.9	<0,0001
$X_2$	339902.5	2	169951.2	63.9	<0,0001
Resíduos	34583.6	13	2660.3		
Total	533616.0	17			

**Figura C.5.** Gráfico de valores preditos versus observados para a resposta remoção de DQO ( $Y_3$ ) após 120 h de experimento.



**Figura C.6.** Gráfico dos resíduos deixados pelo ajuste de um modelo quadrático às respostas de remoção de DQO ( $Y_3$ ) após 120 h de experimento.



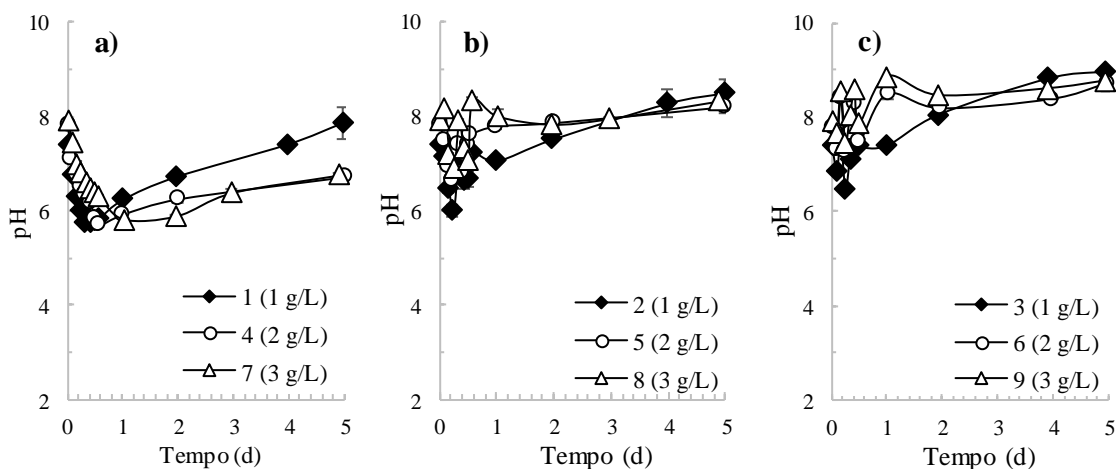
## APÊNDICE D

Parâmetros físico-químicos auxiliares utilizados para monitoramento dos reatores de batelada.

**Tabela D.1.** Valores médios de sólidos suspensos voláteis (SSV), alcalinidade intermediária ( $A_i$ ), alcalinidade parcial ( $A_p$ ) e alcalinidade total ( $A_t$ ) após 120 h de tratamento em diferentes condições experimentais.

Nível	-1	0	1			
$X_1$ - Glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	1	2	3			
$X_2$ - Aeração ( $\text{h.d}^{-1}$ )	0	4	8			
$X_1$	$X_2$	SSV ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$A_i$ ( $\text{mg-CaCO}_3\text{.L}^{-1}$ )	$A_p$ ( $\text{mg-CaCO}_3\text{.L}^{-1}$ )	$A_t$ ( $\text{mg-CaCO}_3\text{.L}^{-1}$ )	
-1	-1	225	229	276	505	
-1	0	260	93	337	430	
-1	1	220	90	454	544	
0	-1	270	272	386	658	
0	0	260	336	380	716	
0	1	395	408	795	1203	
1	-1	410	398	272	670	
1	0	330	450	348	798	
1	1	370	619	756	1375	

**Figura D.1.** Efeitos da concentração de glicose na evolução do pH médio ao longo do tempo. Condições de aeração intermitente: a) 0  $\text{h.d}^{-1}$ ; b) 4  $\text{h.d}^{-1}$ ; e c) 8  $\text{h.d}^{-1}$ .



**Figura D.2.** Efeitos da aeração intermitente na evolução do pH médio ao longo do tempo. Concentração inicial de glicose: a) 1 g.L<sup>-1</sup>; b) 2 g.L<sup>-1</sup>; e c) 3 g.L<sup>-1</sup>.

