JÚLIA HELENA ORTIZ

APLICAÇÕES DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE FERRO

JÚLIA HELENA ORTIZ

APLICAÇÕES DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE FERRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo
2018

JÚLIA HELENA ORTIZ

Aplicações de bactérias redutoras de ferro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider

Versão corrigida.

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ortiz, Júlia Helena
Aplicações de bactérias redutoras de ferro / Júlia Helena Ortiz; orientador René Peter Schneider. São Paulo, 2018. p. 128

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Bactéria redutoras de ferro 2. Remobilização do coagulante 3. Métodos para diferenciação de espécies de Fe 4. $FeCl_3$ 5. Tratamento de água residuária. Schneider, René Peter. Aplicações de bactérias redutoras de ferro.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BOMÉDICAS

Candidato(a): Júlia Helena Ortiz

Título da Tese: Aplicação de bactérias redutoras de ferro

Orientador(a): Prof. Dr. René Peter Schneider

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada no dia 12 /06 / 2018 considerou

(X) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone: (55) (11) 3091-7733 - telefax: (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **518/12** referente ao projeto intitulado: "*Isalamento e caracterização de bactérias redutoras de ferro* " sob a responsabilidade de **Júlia Helena Ortiz,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 10 de abril de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha família, que me apoiou e incentivou nos melhores e piores momentos. Em especial ao meu marido (Lucas) que leu e releu este trabalho diversas vezes, mesmo sem entender muito da área me auxiliou muito, além de ter cuidado, com muito amor da nossa piquitucha Luiza.

O meu eterno agradecimento, sem vocês eu não teria chegado aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que me apoiou durante a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório Luciana, Bianca, Georges, Thiago, Fernando, Luiz Gustavo, Silvia e Larissa, a equipe técnica Andréa, Orlinda, Paulo e Rodrigo, que ajudaram muito para que este trabalho ocorresse.

Agradeço ao professor René Peter Schneider pela orientação e incentivo neste trabalho.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que proporcionaram a realização deste trabalho.

Trabalho realizado com o apoio financeiro (números 1406316 e 1136274):

CAPES

RESUMO

ORTIZ, J. H. **Aplicações de bactérias redutoras de ferro.** 2018. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2018.

O ferro é um importante elemento em reações catalíticas no meio ambiente, pois possui a capacidade de ser reduzido ou oxidado. Duas espécies de ferro solúvel podem estar presentes em amostras ambientais, o Fe (II) e o Fe (III). Métodos analíticos capazes de diferenciar e quantificar estas duas espécies de ferro são muito importantes para a compreensão dos processos metabólicos dos diversos microrganismos, e também para entender a atuação destes microrganismos na remobilização do coagulante utilizado em estações de tratamento de esgotos (ETEs), nas quais é possível utilizar como coagulante o $FeCl_3$. Porém não há trabalhos publicados que recuperam o ferro coagulado utilizando bactérias redutoras de ferro. Os objetivos deste trabalho são: 1) avaliar o método colorimétrico de fenantrolina para quantificação de Fe (II) e os principais interferentes nessas análises; e 2) avaliar o potencial do Fe (II) gerado via metabolismo das bactérias redutoras de ferro como coagulante de matéria orgânica e inorgânica de águas residuárias. Os resultados para o método colorimétrico de fenantrolina são confiáveis somente para leituras de amostras que contenham Fe (II), mas não diferencia e quantifica corretamente espécies de Fe (III) em todos os valores de pH. A separação das diferentes espécies de ferro foi feita utilizando membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm e ajustando o valor do pH para valores entre 4 e 5. Para obtenção das concentrações de Fe (II) e Fe (III), é necessário realizar a leitura em amostras filtradas e não filtradas, pois o Fe (II) passa pela membrana e o Fe (III) fica retido. Desta forma, é possível realizar a distinção das espécies de ferro, e em seguida realizar a quantificação com testes colorimétricos, seja em campo ou em laboratório. A diferenciação das espécies de ferro se mostrou importante para quantificar corretamente o Fe (III) e o Fe (II) durante o tratamento de águas residuárias utilizando Fe (III) como coagulante na forma de $FeCl_3$. Na comparação com a recuperação ácida, a biológica se mostrou mais eficiente por não apresentar metais pesados remobilizados na fração líquida, recuperando 58% do ferro quando adicionado o glicerol como fonte de carbono. Durante a remobilização do ferro houve a produção do metano, gás de interesse econômico. A escolha do coagulante e da concentração foi determinada pela remoção da turbidez, sendo o melhor coagulante para água residuária do CRUSP o $FeCl_3$ na concentração de 60 mg/ L de Fe, pois removeu 99% da turbidez, 98% do fosfato, 85% dos carboidratos e 100% de proteínas presentes na água residuária. Aplicando-se o coagulante remobilizado (400 mg/L), foi possível remover 85% da turbidez. O ferro recuperado servirá novamente como coagulante, favorecendo a redução dos custos com o tratamento de água residuária.

Palavras-chave: Bactérias redutoras de ferro. Remobilização do coagulante. Fenantrolina. ETE. CEPT.

ABSTRACT

ORTIZ, J. H. **Applications of iron-bearing bacteria**. 2018. 128 f. Thesis (Doctorate in Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, 2018.

Iron is an important element in catalytical action in the environment as it has an ability to be filtered or oxidized. Soluble iron species may be present in environmental samples, Fe (II) and Fe (III). Analytical methods capable of differentiating and quantifying these two iron species are very important for the remobilization of coagulation in sewage treatment plants (ETEs), in which $FeCl_3$ can be used as a coagulant. It is not a job that recovers coagulated iron with iron reducing units. The objectives of this work are: 1) to evaluate the colorimetric method of phenanthroline for quantification of Fe (II) and the main interferents in these analyzes; and 2) to evaluate the potential of Fe (II) through the metabolism of iron-reducing bacteria as a coagulant of organic and inorganic wastewater. The results for the colorimetric method of phenanthroline are only for the readings of samples containing Fe (II), but do not differentiate and quantify the Fe (III) species at all pH values. The separation of the fish fiber species was left to the cellulose acetate test with the porosity of 0.2 μm and adjusting the pH value to values between 4 and 5. For the concentration of Fe (II) and Fe (III), it is necessary to read in filtered and unfiltered samples, as Fe (II) passes through the membrane and Fe (III) is retained. In this way, it is possible to perform an analysis of the iron species, and then perform quantification with colorimetric tests, either in the field or in the laboratory. Differentiation of iron species has become important in correctly quantifying Fe (III) and Fe (II) during wastewater treatment using Fe (III) as a coagulant in the form of $FeCl_3$. In comparison with an acid replica, a biological recovery is done through large amounts of remobilized in the liquid fraction, recovering 58% of the iron when the glycerol as carbon source. During the remobilization of the iron there was a production of methane, gas of economic interest. The choice of the coagulant and the capacity was determined by the removal of the turbidity, being the best coagulant for the residual water of the CRUSP the $FeCl_3$ in the concentration of 60 mg/L of Fe, since it removed 99% of the turbidity, 98% of the phosphate, 85% of carbohydrates and 100% of proteins present in the wastewater. Applying the remobilized coagulant (400 mg/L), it was 85% turbidity remover. The recovered iron will again serve as a coagulant, favoring the reduction of costs with the treatment of wastewater.

Keywords: Iron reducing bacteria. Coagulant re-mobilization. Phenantroline. ETE. CEPT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biogeoquímico do ferro. 22

Figura 2 – Representação esquemática de respiração extracelular. 23

Figura 3 – Potencial padrão de óxido-redução (E^0). 26

Figura 4 – Polarograma de microeletrodos. 35

Figura 5 – Curva padrão com diferentes concentrações de Fe (II) (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e 0 ppm). Cada medida foi realizada em duplicata. 39

Figura 6 – Análise de amostras de cloretos de Fe (II) e de Fe (III) em água ultrapura pelo método de fenantrolina. Ensaios realizados em triplicata. A linha refere-se a concentração presente na amostra. 39

Figura 7 – Determinação de Fe total e Fe (II) pelo *Kit* (CHEMetrics – K-6010) em amostras contendo 208 mg/L de Fe (III). 40

Figura 8 – Concentração de Fe total analisado por espectroscopia de absorção atômica no filtrado de amostras de 50 mg/L $FeCl_3$ puro dissolvido em água ultrapura em diferentes pHs filtradas com membranas de 0,2 e 0,45 µm. Realizado em triplicata. 41

Figura 9 – Concentração de Fe total analisado por espectroscopia de absorção atômica no filtrado de amostras de 50 mg/L $FeCl_2$ puro dissolvido em água ultrapura em diferentes pHs filtradas com membranas de 0,2 e 0,45 µm. Realizado em triplicata. 41

Figura 10 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_2$ (30 mg/L). Análise por espectroscopia de absorção atômica. 42

Figura 11 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_2$ (250 mg/L). Análise realizada por espectroscopia de absorção atômica. 42

Figura 12 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_3$ (30 mg/L). Análise realizada por espectroscopia de absorção atômica. 43

Figura 13 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_3$ (250 mg/L). Análise realizada por espectroscopia de absorção atômica. 43

Figura 14 – Fotografia das amostras contendo Cloreto Férrico ($FeCl_3$ – 50 mg/L) em diferentes valores de pH (1, 2, 3 e 4). 44

Figura 15 – Concentração de Fe total em amostras contendo a mistura de $FeCl_2$ e $FeCl_3$ (ambos na concentração de 250 mg/L, diluídos em água ultrapura) quantificado por espectroscopia de absorção atômica. Amostras após a filtração em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm. 45

Figura 16 – Fotografia do resultado obtido antes e depois da filtração em membrana de acetato de celulose, com porosidade de 0,2 µm. A amostra continha as duas

diferentes espécies de ferro (Fe II e Fe III), na concentração de 50 mg/L e em pH = 6. 45

Figura 17 – Resultado do ensaio de filtração em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,2 e 0,45 µm. A amostra continha $FeCl_2$ e $FeCl_3$ (na concentração de 50 mg/L de Fe), em diferentes valores de pH (1, 2, 3 e 6). 46

Figura 18 – Voltamogramas de soluções de $FeCl_2$ (50 mg/L diluído em água ultrapura) em pH 1, 2, 3 e 4 após a filtração em membrana de acetato de celulose 0,2 µm. 47

Figura 19 – Determinação de Fe (III) em potenciostato após a filtração em membrana de celulose 0,2 µm. Foi avaliado o comportamento do Fe (III) em diferentes valores de pH (1, 2, 3 e 4). 47

Figura 20 – Curvas de pulso diferencial obtidas na determinação do padrão de Fe (II), na concentração de 1000 mg/L. 48

Figura 21 – Curva padrão de Fe (II) com adições de 0,05 mL. 49

Figura 22 – Curvas de pulso diferencial obtidas na determinação do padrão de Fe (III), na concentração 1000 mg/L. 49

Figura 23 – Curva padrão de Fe (III) com adições de 0,05 mL. 50

Figura 24 – Ilustração da formação do complexo de Fe (II) com a fenantrolina. 51

Figura 25 – Diagrama de Pourbaix de Fe – H_2O. 52

Figura 26 – Classificação e distribuição dos sólidos presentes na água em função do tamanho. 63

Figura 27 – Remoção da turbidez da água residuária tratada com diferentes coagulantes. Os coagulantes testados foram $FeCl_3$, $FeCl_2$, $FeSO_4$ e $Fe_2(SO_4)_3$. As concentrações avaliadas foram 1, 10, 20, 40 e 60 mg/L de Fe. 74

Figura 28 – Ensaio em *Jar Test* com diferentes coagulantes $FeCl_3$, $FeCl_2$, $FeSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$. Fe após 10 minutos de decantação. Da direita para a esquerda as concentrações utilizadas foram 1, 10, 20, 40 e 60 mg/L de Fe. A - $FeCl_3$; B - $FeCl_2$; C - $FeSO_4$; D - $Fe_2(SO_4)_3$. 74

Figura 29 – Porcentagem de remoção de Sólidos Totais (ST), Sólidos Fixos Totais (SFT) e Sólidos Voláteis Totais (SVT) de água residuária tratada com $FeCl_2$ e $FeCl_3$ nas seguintes concentrações 40 e 60 mg/L de Fe. Ensaio realizado em triplicata. 77

Figura 30 – Remoção do fosfato presente em 2 litros de amostra de água residuária com 60 mg/L $FeCl_3$. Ensaio realizado em triplicata. 78

Figura 31 – Carboidratos na água residuária bruta, no lodo coagulado e no sobrenadante do lodo coagulado após coagulação com 60mg/L $FeCl_3$. Ensaio realizado em triplicata. 78

Figura 32 – Proteínas no efluente bruto, lodo coagulado com $FeCl_3$ (60 mg/L) e sobrenadante do lodo coagulado.Ensaio realizado em triplicata. 79

Figura 33 – Alcalinidade do efluente bruto e do sobrenadante do lodo coagulado. 79

Figura 34 – Nitrogênio orgânico e amônia em água residuária antes e após a coagulação. 80

Figura 35 – Produção de ferro sem adição de fontes de carbono em pH = 3. Foram avaliadas as bactérias presentes da própria amostra, do consórcio e do controle. 81

Figura 36 – Remobilização do Fe em pH= 5, sem adição de fontes de carbono.Foram utilizadas como inóculos as bactérias da própria amostra e do consórcio. Para

o grupo controle foram esterilizadas as amostras. Ensaios realizados em triplicatas. 82

Figura 37 – Análise do ferro total nas amostras: controle (esterilizado), bactérias presentes na própria amostra de água residuária e bactérias presentes no ensaio anterior (2 mL) junto com as bactérias presente da água residuária. Sem adições de doadores de elétrons externo. 83

Figura 38 – Análise de proteínas durante a recuperação do ferro no grupo controle e no grupo contendo bactérias redutoras de ferro. Realizado em triplicata. 83

Figura 39 – Consumo de carboidratos e produção de ferro no decorrer do experimento do reciclo em amostras controle e amostras contendo bactérias redutoras de ferro. Ensaios realizados em triplicata. 84

Figura 40 – Porcentagem de recuperação do ferro na presença de acetato como fonte de carbono (1 g/L), utilizando bactérias da própria amostra e bactérias do consórcio. Realizado em triplicata. 85

Figura 41 – Recuperação do ferro utilizando glicose como fonte de carbono (1 g/L). Utilizaram-se como inóculo as bactérias presentes da própria amostra de água residuária e bactérias do consórcio. 85

Figura 42 – Comportamento da fração líquida e sólida, após 30 dias de incubação à 37ºC, sem agitação e com volume para cada frasco de 500 mL. A - Amostras estéreis; B – Bactérias da própria amostra; C – Bactérias da própria amostra com bactérias isoladas do ensaio anterior da remobilização do Fe. 87

Figura 43 – Cromatograma do gás dióxido de carbono (CO_2). 88

Figura 44 – Cromatograma do gás metano (CH_4). 89

Figura 45 – Cromatograma dos gases: metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). 90

Figura 46 – Cromatograma do gás da amostra contendo as bactérias redutoras de Fe. 90

Figura 47 – Filtração e oxidação das amostras. A - Filtração das amostras antes da oxidação; B – Comparações de cores nas diferentes amostras. 91

Figura 48 – Formação de óxidos de Fe (III) após a aeração das amostras e com 30 minutos de sedimentação natural. 92

Figura 49 – Porcentagem de recuperação do coagulante ($FeCl_3$ – 117 mg) nos grupos controle (estéril)e reciclo de ferro. 93

Figura 50 – Amostra controle do ensaio de recuperação do coagulante ($FeCl_3$ – 117 mg). Após 40 dias foi adicionado 50 mg/L de glicose. 94

Figura 51 – Ensaio da recuperação do ferro com bactérias da própria amostra de água residuária. Adição de glicose (50 mg) após 40 dias de ensaio. Realizado em triplicata. 95

Figura 52 – Ensaio de regeneração do coagulante ($FeCl_3$ – 117 mg), utilizando bactérias novas e anteriores. Realizado em triplicata. 96

Figura 53 – Quantificação de ferro no ensaio de regeneração do coagulante utilizando diferentes fontes de carbono (nenhuma – controle, sacarose, acetato, glicose e glicerol) todos na concentração de 0,277 mmol. 97

Figura 54 – Proteínas no ensaio de regeneração do coagulante utilizando diferentes fontes de carbono (controle, sacarose, acetato, glicose e glicerol) todos na concentração de 0,277 mmol. Realizado em triplicata. 97

Figura 55 – Carboidratos em ensaio de recuperação do ferro com diferentes fontes de carbono (controle - nenhuma, sacarose, acetato, glicose e glicerol) todos na concentração de 0,277 mmol. Realizado em triplicata. 98

Figura 56 – Identificação das bactérias remobilizadoras do ferro utilizando glicerol como fonte de carbono (na concentração de 0,277 mmol)..... 99

Figura 57 – Ensaio de coagulação utilizando as diferentes formas férricas do ferro reciclado. As formas férricas testadas foram $FeCl_3$ (sal), Fe (II) direto (reciclado), Fe (III) oxidado (reciclado), Fe (III) oxidado na coagulação (reciclado) e a amostra de água residuária bruta (Bruto). Utilizou 60 mg/L de Fe. 100

Figura 58 – Avaliação da capacidade de coagulação do ferro recuperado e do coagulante novo em reduzir a turbidez da água residuária do CRUSP, na concentração de 400 mg/L de Fe. Realizado em triplicata. 101

Figura 59 – Enzimas necessárias para utilizar o glicerol como fonte de energia ou como precursos de moléculas. A - glicerol quinase. B - frutose-1,6-bisfosfatase..... 103

Figura 60 – Associação de bactérias redutoras de ferro com metanogênicas..... 106

Figura 61 – Diagrama de solubilidade do hidróxido de ferro em água. 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise elementar por Espectrometria de Emissão Óptica (ICP) na fração líquida após recuperação do ferro coagulado..... 86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AQDS	Antraquinona-2,6-disulfonato
BRFD	Bactéria Redutora de Ferro Dissimilatória
BSA	Albumina de Soro Bovino
CEPT	Tratamento Primário Quimicamente Assistido
cDNA	DNA complementar
CIRRA	Centro Internacional de Referência em Reuso de Água
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CT	Carbono Total
CRUSP	Conjunto Residencial da Universidade de São Paulo
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DEPC	Dicarbonato de dietila
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
Fe (II)	Ferro Ferroso
Fe (III)	Ferro Férrico
GC	Cromatografia Gasosa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Carbono Inorgânico
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LAREX	Laboratório de Reciclagem, Tratamento de Resíduos e Metalurgia Extrativa
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight
NDIR	Detector de Infravermelho Não Dispersivo
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SS	Sólidos em Suspensão

SSF	Sólidos em Suspensão Fixos
SSV	Sólidos em Suspensão Voláteis
ST	Sólidos Totais
SFT	Sólidos Fixos Totais
TOC	Carbono Orgânico Total
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 21
1.1 Redução dissimilatória do ferro 21
1.2 Bactérias redutoras de ferro 23
1.3 Aplicações de bactérias redutoras de ferro 25
1.4 Tratamento de água residuária 27
2 OBJETIVOS 29
3 CAPÍTULO 1 30
3.1 INTRODUÇÃO 30
3.1.1 Quantificação de Fe (II) pelo método de fenantrolina – Segundo Standard Methods 31
3.1.2 Kits de Campo 32
3.1.3 Uso da fenantrolina para quantificação de Fe total e Fe (II) 33
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS 36
3.2.1 Quantificação de Fe (II) e Fe total por fenantrolina 36
3.2.2 Determinação de *Ferro total* 36
3.2.3 Determinação de *Ferro (II)* 37
3.2.4 Análise de ferro com o kit CHEMetrics 37
3.2.5 Análise de ferro com potenciostato 37
3.2.6 Análise do ferro total em espectrofotômetro de absorção atômica 38
3.2.7 Análise voltamétrica de Fe (II) e Fe (III) 38
3.3 RESULTADOS 39
3.3.1 Curva padrão para a quantificação de Fe (II) com fenantrolina 39
3.3.2 Avaliação do método de fenantrolina: reagentes preparados no laboratório 39
3.3.3 Avaliação do método de fenantrolina: reagentes presentes no kit comercial 40
3.3.4 Diferenciação das espécies de ferro por filtração 40
3.3.5 Formação de hidróxidos 43
3.3.6 Análise em potenciostato 46
3.3.7 Análise voltamétrica de Fe (II) e Fe (III) 48
3.4 DISCUSSÃO 50
3.4.1 Interferência do Fe (III) 50
3.4.2 Filtração 51
3.4.3 Oxidação 53
3.4.4 Potenciostato 53

3.4.5 Análises voltamétricas de pulso diferencial 54
3.4.6 Testes colorimétricos 55
3.5 CONCLUSÃO 55
4 CAPÍTULO 2 57
4.1 INTRODUÇÃO 57
4.1.1 Água Residuária 57
4.1.2 Tratamento de Efluentes 59
4.1.2.1 Tratamento Preliminar 59
4.1.2.2 Tratamento Primário 60
4.1.2.3 Tratamento Secundário 60
4.1.2.4 Tratamento terciário 60
4.1.3 CEPT 61
4.1.4 Coagulação química 62
4.1.5 Remobilização do coagulante 63
4.1.6 Remobilização ácida 64
4.1.7 Vantagens e desvantagens na remobilização do coagulante 64
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS 65
4.2.1 Coagulação 65
4.2.1.1 Água residuária 65
4.2.1.2 Ensaios de coagulação em frascos Schott 65
4.2.1.3 Ensaios de coagulação em Jar Test 66
4.2.2 Sólidos voláteis totais e sólidos fixos totais 66
4.2.3 Quantificação de fosfato 67
4.2.4 Quantificação de carboidratos / açúcares 67
4.2.5 Quantificação de proteínas 68
4.2.6 Alcalinidade por titulação 68
4.3.7 Carbono Orgânico Total (COT) 69
4.2.8 Quantificação de nitrogênio total 69
4.2.9 Análise de gases 69
4.2.10 Análise de metais no sobrenadante dos ensaios de recuperação de coagulantes 70
4.2.11 Identificação de microrganismos redutores de ferro em minério de ferro por MALDI-TOF 70
4.2.12 Identificação das bactérias redutoras de ferro por sequenciamento de nova geração 71
4.2.12.1 Tratamento com DNAse 72
4.2.12.2 Purificação do RNA 72
4.2.12.3 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 72
4.2.12.4 Processamento por bioinformática e banco de dados 73

4.2.13 Estatística 73
4.3 RESULTADOS 73
4.3.1 Coagulação 73
4.3.2 Remobilização do ferro coagulado 80
4.3.3 Oxidação do ferro 91
4.3.4 Análise do comportamento microbiano 92
4.3.5 Aplicação do ferro recuperado 99
4.4 DISCUSSÃO 101
4.4.1 Remobilização biológica do coagulante a base de Fe 101
4.4.2 Análise do sal de $FeCl_3$ utilizado como coagulante 104
4.4.3 Produção de metano 106
4.4.4 Aplicação do ferro remobilizado 107
4.4.5 Análise da comunidade bacteriana 108
4.5 CONCLUSÃO 109
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111

1 INTRODUÇÃO GERAL

O ferro é um dos elementos mais abundantes da terra. Sua extração na natureza é sob a forma de minério de ferro, e este, por sua vez é o metal mais utilizado (com 95% em peso da produção mundial de metal), devido ao seu baixo preço e dureza torna-se indispensável sua utilização em automóveis, barcos e componentes estruturais de edifícios. Os principais tipos de minério de ferro são a hematita (Fe_2O_3), a magnetita (Fe_3O_4), a limonita ($Fe_2O_3.H_2O$), a siderita ($FeCO_3$), a pirita (FeS_2) e a ilmenita ($FeTiO_3$).

O ferro é abundante no subsolo, sendo potencialmente o maior aceptor de elétrons no local. A redução de ferro em ambientes naturais é predominantemente catalisada por bactérias redutoras de ferro dissimilatórias (BRFD). Desta forma, a redução do ferro deve ser uma característica comum compartilhada por uma grande diversidade de microrganismos (RÖLING *et al*., 2003). Essas bactérias são capazes de reduzir o ferro férrico (ferro III) utilizando-o como aceptor de elétrons acoplado com a oxidação da matéria orgânica ou H_2 e obter energia para a manutenção e crescimento (FREDRICKSON e GORBY 1996; SCALA *et al*. 2006). A redução de ferro dissimilatória é importante no processo de degradação de matéria orgânica de ocorrência natural em sedimentos aquáticos, bem como a de contaminantes nos aquíferos poluídos (LOVLEY, 1991, 1994).

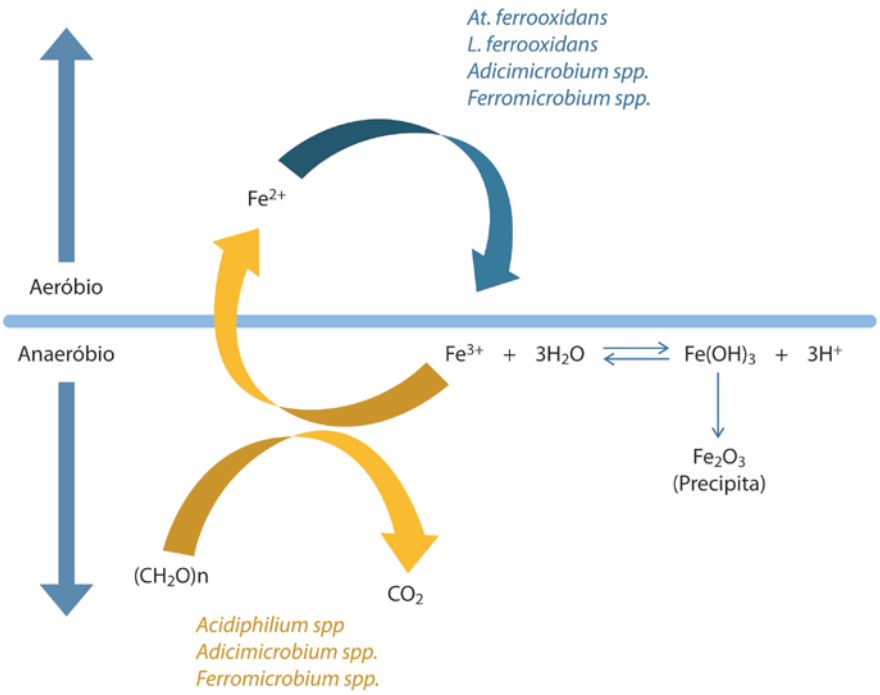
1.1 Redução dissimilatória do ferro

Por ser um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, o ferro é o aceptor de elétrons mais disponível. O uso de metais como aceptor final de elétrons é conhecido como “redução dissimilatória do metal”. A redução de ferro em ambientes naturais é predominantemente catalisada por bactérias (RÖLING *et al*., 2003). Estas bactérias são capazes de reduzir o ferro férrico (Fe III) utilizando-o como aceptor final de elétrons acoplado com a oxidação da matéria orgânica ou H_2 e obter energia para a manutenção e crescimento (FREDRICKSON e GORBY, 1996; SCALA *et al*., 2006).

Devido à insolubilidade do Fe (III) em pH neutro, por muito tempo, a rota abiótica foi considerada a principal e até mesmo a única forma de reduzir Fe (III), pois acreditava-se que o ferro só estaria biodisponível se estivesse solúvel (LOVLEY, 1991).

Os principais responsáveis pela redução do ferro no ciclo biogeoquímico são os microrganismos (Figura 1). Esta redução ocorre extracelularmente, isto é, os elétrons derivados da oxidação dos doadores de elétrons são transferidos até a superfície externa da célula para reduzir o aceptor de elétron terminal (substrato insolúvel) (LOVLEY, 2008).

Figura 1 – Ciclo biogeoquímico do ferro.



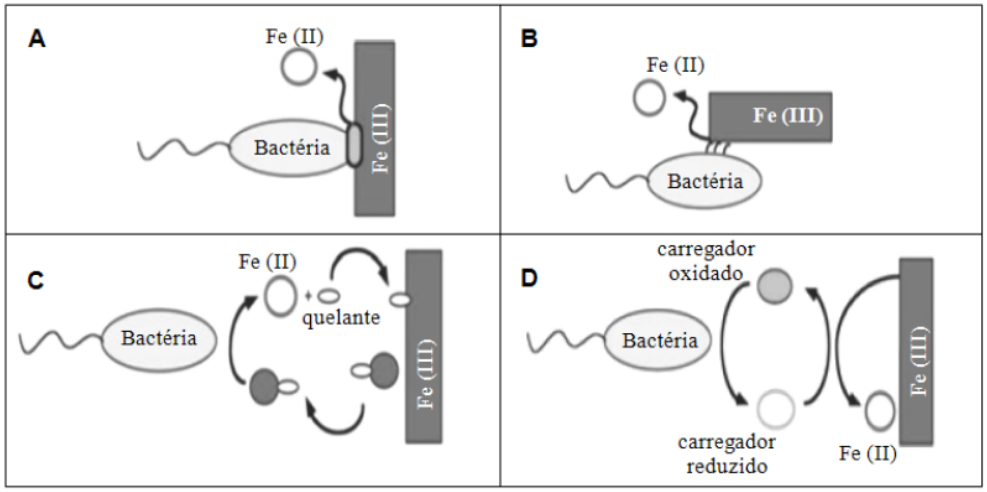
Fonte: CASTRO *et al.*, 2013.

A respiração microbiana utilizando o óxido de Fe (III) como aceptor final de elétrons é reconhecida como um importante processo em ambientes anaeróbios (LUU e RAMSAY, 2003). Esta respiração é mais favorável energeticamente do que a de outros aceptores finais de elétrons, por exemplo, a produção de energia utilizando o íon ferro como aceptor final é mais favorável do que o íon sulfato (LOVLEY *et al.*, 1989).

A interação entre microrganismo e o ferro ocorre de várias maneiras, com ou sem especificidade, mas geralmente é espécie-específica (LEDIN, 2000; NEWMAN e BANDIELD, 2002; MACALADY e BANDIELD, 2003). Os mecanismos de transferência de elétrons pelos quais os microrganismos respiram extracelularmente ainda são pouco compreendidos (LEANG *et al.*, 2005; GRALNICK e NEWMAN, 2007; SHI *et al.*, 2007). Alguns dos mecanismos de transferências de elétrons propostos são: o contato direto entre a célula e o substrato; a formação de uma ponte entre a célula

e o substrato, por meio de *pili*; e a liberação de uma pequena molécula (quelante) ou carreador de elétrons (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática de respiração extracelular.



Fonte: GRALNICK e NEWMAN, 2007. adaptado por SILVA, 2009.
L**egenda:** O substrato Fe (III), nestas figuras, é representado como um retângulo e o seu produto reduzido, (Fe II), como um círculo (o). Em A, célula em contato direto com o substrato. B, um apêndice celular (*pili*) forma uma ponte entre a célula e o substrato. C e D: a célula libera uma pequena molécula (quelante, C) ou carreador de elétrons (D).

A capacidade dissimilatória do ferro já foi descrita em diversos microrganismos (desde psicrofílicos, mesofílicos até hipertermofílicos), dos domínios *Archaea* e *Bacteria* (LIU *et al*., 1997; SLOBODKIN *et al*., 1999; HEAD *et al*., 2003; HAMAMURA *et al*., 2006; WEBER *et al*., 2006). Além do ferro, alguns destes organismos podem reduzir outros metais, como cobalto, vanádio, urânio e manganês (MARSHALL *et al*., 2006) e uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo fumarato, nitrato, nitrito e tiossulfato.

A redução de ferro (III) para o ferro (II) está intimamente relacionada com o crescimento bacteriano em muitos ambientes anaeróbios, onde na ausência de ferro (III) não foi observado crescimento. Muitas bactérias anaeróbias redutoras de ferro (III) podem utilizar o nitrato com um aceptor final de elétrons. Organismos que utilizam o ferro (III) como aceptor final de elétrons vêm sendo utilizados em estudos de corrosão (VIDELA e HERRERA, 2009).

1.2 Bactérias redutoras de ferro

De todas as cepas identificadas como bactérias redutoras de ferro, as mais estudadas são *Geobacter* e *Shewanella* spp. (LOVLEY *et al*., 2004; WANG *et al*.

2009). A bactéria *Geobacter metallireducens* GS 15 foi isolada pela primeira vez em sedimento aquático por Lovley em 1987. As bactérias do gênero *Geobacter* são encontradas em ambientes de sedimento anóxico e podem reduzir o Fe (III) acoplado com a oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, alcoóis, compostos monoaromáticos e hidrogênio (LOVLEY *et al*., 1993, 2004; NEVIN *et al*., 2005). Já todas as bactérias do gênero *Shewanella* são Gram-negativas e apresentam mobilidade por causa da presença de flagelo. A espécie *Shewanella putrefaciens* MR-1, CN32 e SP200 é anaeróbia facultativa, portanto, pode crescer na presença ou ausência do oxigênio (PICARDAL *et al*., 1995; LIU *et al*., 2001; LOVLEY *et al*., 2004). A bactéria *Shewanella putrefaciens* MR-1 é encontrada em solos, sedimentos e ambientes aquáticos (águas doces e salgadas), e tem capacidade para conservar energia para o crescimento utilizando oxigênio ou Fe (III) como aceptor final de elétrons (LOWER *et al*., 2001). Alguns ambientes aquáticos, sedimentos e solos, são ricos em manganês e óxidos de ferro, e a *S. oneidensis* pode contribuir para a solubilização redutora dos metais presentes (MYERS e MYERS, 2003).

A bactéria *Ferribacterium limneticum*foi isolada de uma área de mineração. Essa bactéria possui capacidade de reduzir o Fe (III) utilizando como doador de elétron o acetato e como aceptor final de elétrons o oxihidróxido de Fe (III) (CUMMINGS *et al*., 1999). Bactérias acidofílicas como a *Acidithiobacillus ferrooxidans* podem obter energia através da oxidação do Fe (II) para o Fe (III) em ambientes aeróbios ou da redução do ferro férrico usando o enxofre como doador de elétrons em ambientes anaeróbios (OHMURA *et al*., 2002).

A bactéria *Shewanella putrefaciens* foi descrita como redutora de jarosita (minério de ferro), e com adição de antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) o processo de redução do ferro acontece em intervalo menor de tempo (CASTRO *et al.*, 2013). De acordo com Lovley e colaboradores (2004) os gêneros *Desulfovibrio.* e*Vibrio* são redutoras de Fe (III).Alguns termófilos ferro-oxidantes tais como *Sulfobacillus* sp., *Acidimicrobium* sp. e *Thermoterrabacterium ferrireducens* também podem reduzir o Fe (III) de minerais utilizando o glicerol como doador de elétrons sob condições limitadas de oxigênio (BRIDGE e JOHNSON 1998; SLOBODKIN, 2005).

Algumas bactérias redutoras de ferro foram isoladas de solo de cultivo de arroz, identificadas como *Paenibacillus spp., Clostridum spp., Solibacillus spp., Lysinibacillus spp., Bacillus spp. (microaerofílicas), Azotobacterspp., Pseudomonasspp*. foram

enriquecidas com diferentes fontes de carbono (glicose, piruvato, lactato e acetato) (YI *et al.*, 2012).

Diferentes doadores de elétrons podem ser utilizados por estas bactérias, incluindo compostos orgânicos, substâncias fermentáveis (glicose, aminoácidos e etc.), compostos aromáticos (tolueno, benzeno), ácidos graxos de cadeia curta ou longa, acetato, hidrogênio, contaminantes orgânicos, entre outros. A escolha do doador de elétrons depende principalmente do tipo de bactéria, das condições do ambiente e de outros fatores (CASTRO *et al.*, 2013).

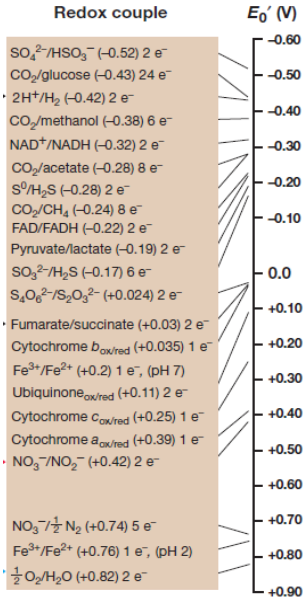
King e Garey (1999) sugeriram que as bactérias redutoras de ferro presentes em rizomas de macrófitas aquáticas, reduzem os ácidos húmicos (compostos orgânicos naturalmente encontrados em solos, sedimentos e na água resultante da transformação de resíduos vegetais) e limitam a disponibilidade de matéria orgânica para outros microrganismos heterotróficos tanto na rizosfera quanto no sedimento.

1.3 Aplicações de bactérias redutoras de ferro

Microrganismos redutores de ferro possuem grande potencial para aplicação biotecnológica na biorremediação. A utilização de processos biológicos aplicados à recuperação ou remediação de áreas contaminadas é denominada de biorremediação (COOKSON, 1995; ROSA, 2001). Essa tecnologia utiliza microrganismos para a degradação de várias substâncias químicas tóxicas ou pouco tóxicas, a níveis aceitáveis do contaminante no ambiente como solo, água ou ar (TIBURTIUS *et al.*, 2004). Microrganismos capazes de reduzir Fe (III) e crescer na presença dos diversos hidrocarbonetos constituintes do petróleo podem ser úteis neste processo de biorremediação (SILVA *et al.*, 2007).O aumento na concentração de Fe (II) no meio é um forte indicativo da degradação dos contaminantes (MAZZUCO, 2004).

Em pH neutro, alguns microrganismos podem utilizar o Fe (III) (E^0 = 0,20 V) como aceptor final de elétrons durante a degradação do benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos, porém somente na ausência de oxigênio (E^0 = 0,82 V)ou nitrato (E^0 = 0,42 V) (DETHLEFSEN *et al.*, 2004) (Obs.: maiores valores de E^0 indicam um maior potencial da substância de receber elétrons – potencial padrão de redução). No entanto, em meio ácido, esses mesmos microrganismos podem utilizar o Fe (III) como aceptor final de elétrons ao invés do nitrato, pois em pH ácido (pH~2) o E^0 do Fe (III) é de 0,76 V (Figura 3).

Figura 3 – Potencial padrão de óxido-redução (E^0).



Fonte: MADIGAN *et al.*, 2004.

Os valores de E^0 mais positivos correspondem aos pares redox de maior potencial oxidante.

Um dos principais problemas ambientais dos ecossistemas aquáticos é o processo de eutrofização, causado pelo enriquecimento de nutrientes nos corpos d'água, principalmente nitrogênio e fósforo, provocando o crescimento acelerado de algas. Com o aumento da biomassa, o oxigênio dissolvido diminui, causando a morte e consequentemente a decomposição de muitos organismos, reduzindo a qualidade da água (WITHERS *et al.* 2011), portanto a remoção do fosfato é extremamente importante. As bactérias redutoras de ferro podem ser utilizadas para remover o fosfato de águas residuárias, pois oxidam a matéria orgânica em condições anaeróbias e utilizam o Fe (III) como aceptor final de elétrons, liberando o Fe (II) para o meio, o qual se liga e precipita o fosfato (IVANOV *et al.*, 2005).

Segundo Ivanov e colaboradores (2009) uma aplicação de bactérias redutoras de ferro é na precipitação de fosfato em água residuária. Trata-se de uma tecnologia inovadora, pois diminui drasticamente os gastos com coagulantes, substituindo estes por Fe (II) produzido pelas bactérias, que utilizam o minério de ferro como aceptor final de elétrons ou que atuem reciclando o Fe (III) contido no coagulante para tratar efluentes.

Outra aplicação de bactérias redutoras de ferro, descoberta neste trabalho, é no tratamento de esgoto, por meio de remobilização do ferro utilizado como coagulante. É uma aplicação muito vantajosa, devido à viabilidade econômica.

1.4 Tratamento de água residuária

Segundo IBGE no ano de 2008 apenas 55,1% dos municípios brasileiros possuíam rede coletora de esgoto (água residuária). Em muitos estados a taxa de tratamento de esgoto coletado passa de 70%, destacando-se Roraima, Rio de Janeiro, Paraná e Distrito Federal. Porém, sabe-se que ainda falta muito para alcançar 100% e um dos principais problemas que colaboram para a falta deste tratamento em diversos municípios é o custo.

Para atender todos os municípios, o Instituto Trata Brasil acredita que seja necessário um investimento de R$ 303 bilhões em 20 anos para a universalização da água e esgoto. Os estados que tiveram maiores investimentos em saneamento básico (tratamento de água e esgoto) foram São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e Bahia e os menores investimentos no Amazonas, Acre, Amapá, Alagoas e Rondônia.

O custo do tratamento do esgoto irá depender da composição do efluente e o nível do tratamento necessário para atender as características de lançamento diretamente ou indiretamente no corpo d'água, conforme a Resolução CONAMA 430/2011.

O tratamento do efluente é dividido em tratamento primário, secundário e terciário. Destaca-se o tratamento terciário devido à rapidez do tratamento que se baseia no processo físico-químico, no qual uma substância química chamada de coagulante ajuda na formação de flocos de partículas suspensas presentes no esgoto. Existem vários coagulantes no mercado, mas os mais utilizados são os sais de alumínio e ferro.

A coagulação química é o processo de desestabilização das partículas coloidais em meio aquoso. Estes colóides, na ausência do coagulante, possuem propriedades elétricas que resultam em uma força de repulsão entre eles, a qual impede a aglomeração e a sedimentação. O papel do coagulante é desestabilizar a suspensão coloidal reduzindo todas as forças repulsivas, desse modo baixando a barreira energética, permitindo que as partículas colidam e se agreguem (TCHOBANOGLOUS *et al.*, 1991). Dessa forma, facilitam a remoção destas impurezas em meio aquoso. As impurezas ficam separadas no fundo dos decantadores e são chamadas de lodos. Sabe-se que a adição de coagulantes aumenta significativamente a quantidade de lodos nos decantadores e o custo do tratamento.

Uma alternativa para reduzir os custos do tratamento de esgotos é a recuperação do coagulante, ou seja, retirá-lo do lodo antes de ser descartado. Existem muitos trabalhos que recuperam o coagulante por meio da utilização de compostos ácidos,

básicos, solventes orgânicos e quelantes (DANDOLINI, 2014, GUIMARÃES, 2005, OKUDA *et al*., 2014; YANG *et al*., 2014).

A busca de soluções economicamente viáveis e ambientalmente vantajosas para o tratamento e disposição final de lodos ETEs, continua sendo um grande desafio em todos os países, principalmente no Brasil. Diferentes alternativas de uso benéfico do lodo têm sido adotados nos países do hemisfério norte e, além de vantagens econômicas, vêm transformando, em larga escala, resíduos em recursos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar as possíveis aplicações biotecnológicas de bactérias redutoras de ferro.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- ✓ Avaliar o método colorimétrico de fenantrolina para quantificação de Fe (II) e os principais interferentes nessas análises - Capítulo 1;
- ✓ Avaliar o potencial do Fe (II) gerado via metabolismo das bactérias redutoras de ferro, como coagulante de matéria orgânica e inorgânica de águas residuárias - Capítulo 2.

3 CAPÍTULO 1

3.1 INTRODUÇÃO

O ferro é um importante elemento em reações catalíticas no meio ambiente, pois possui a capacidade de ser reduzido ou oxidado.

Duas espécies de ferro solúvel podem estar presentes em amostras ambientais, o Fe (II) e o Fe (III).

- O Fe (III) é a espécie mais oxidada, comum em ambientes que possuem altas concentrações de oxigênio. A presença desta espécie indica que o ambiente provavelmente é aeróbio e que os microrganismos estão utilizando o ferro como doador de elétrons. Segundo Pourbaix, o Fe (III) é solúvel apenas entre pH de 0 a 2.

- O Fe (II) é a espécie encontrada em ambientes anaeróbios e é instável em ambientes contendo oxigênio, o qual oxida rapidamente. A presença desta espécie indica que o ambiente é livre de oxigênio e que microrganismos estão utilizando o ferro como aceptor final de elétrons. Segundo Pourbaix a espécie de Fe (II) é mais solúvel em pH de 0 a 10.

Nesta tese a importância da diferenciação das espécies de ferro é devido à redução do Fe (III) por bactérias redutoras de ferro, que atuam remobilizando o ferro, utilizado como coagulante na forma de $FeCl_3$, convertendo para Fe (II). A espécie Fe (II) é mais solúvel, o que facilita a sua recuperação na fração líquida. O ferro recuperado servirá novamente como coagulante.

Técnicas colorimétricas são frequentemente utilizadas na análise de ferro principalmente pela facilidade de sua aplicação em campo por meio de kits. Dentre estas técnicas existem atualmente os métodos de ferrozina e fenantrolina para determinar concentrações de ferro total e ferro ferroso em estudos geomicrobiológicos (BRAUNSCHWEIG *et al*., 2012). Ensaios baseados em tiocianato permitem determinar

somente Fe (III). Dentre estes métodos, o mais utilizado é o método de fenantrolina, descrito no Standard Methods (2012).

3.1.1 Quantificação de Fe (II) pelo método de fenantrolina – Segundo Standard Methods

O método da fenantrolina é uma metodologia amplamente adotada por pesquisadores para quantificar o íon Fe (II) (EISELE, 2005; IVANOV *et al.*, 2009; GOU *et al.*, 2010; NOUREDDINE *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2014). Segundo Braunschweig e colaboradores (2012) o método de fenantrolina é mais preciso quando comparado com o da ferrozina, na análise de ferro ferroso e ferro total durante o crescimento bacteriano.

A fenantrolina é um composto orgânico heterocíclico com a fórmula molecular $C_{12}H_8N_2$ e nome IUPAC 1,10-fenantrolina (Figura 24). Este composto é tóxico e perigoso para o meio ambiente, sendo muito utilizado como agente quelante para íons metálicos, como ferro, níquel, prata e outros.

A determinação do Fe (II) pelo método de fenantrolina é realizada por espectrofotometria, na qual o ferro solúvel é quelado por três moléculas de 1,10-fenantrolina para formar um complexo alaranjado de intensidade de cor proporcional à concentração de ferro. É uma metodologia colorimétrica que obedece à lei de Beer, na faixa de pH entre 3 e 9.Este método é mais específico do que a absorção atômica (STANDARD METHODS, 2012), apesar da necessidade de cuidados especiais no momento da coleta, pois o Fe (II) é oxidado rapidamente na presença de oxigênio, transformando-se em Fe (III). Uma forma de prevenir a sua oxidação é purgando nitrogênio. A luz também interfere na estabilidade do Fe (II), portanto é necessário realizar a análise em ambiente escuro.

Segundo o próprio Standard Methods (2012) é possível separar o ferro solúvel e o coloidal das demais espécies de ferro em membrana com porosidade 0,45 µm, o que torna a filtração uma das principais formas de diferenciação das espécies de ferro. A recomendação do Standard Methods é que imediatamente após a filtração seja adicionado1 mL de ácido clorídrico (concentrado) a cada 100 mL de amostra. A adição do ácido permite manter o Fe (II) em solução e impede a sua oxidação.

Como o método de fenantrolina apenas determina o Fe (II), para análise de ferro total, todo Fe (III) presente na amostra deve ser convertido para Fe (II), utilizando o cloridrato de hidroxilamina como reagente (Equação 1).

Equação 1: $2\ NH_2OH + 4\ Fe^{3+} = N_2O + 4\ Fe^{2+} + H_2O + 4\ H^+$

Fonte: RAO e SOMIDEVAMMA, 1959.

Interferentes do método de fenantrolina incluem agentes oxidantes como o cianeto e nitrito, fosfatos (polifosfatos interferem mais do que ortofosfato), cromo, zinco (na concentração 10 vezes maior do que ferro), cobalto e cobre acima de 5 mg/L e níquel acima de 2 mg/L (STANDARD METHODS, 2012). Segundo o Standard Methods (2012), o emprego de hidroxilamina em excesso neutraliza as interferências causadas por oxidantes fortes. Outros compostos como bismuto, cádmio, mercúrio, molibdato e prata precipitam a fenantrolina (STANDARD METHODS, 2012).

3.1.2 Kits de Campo

Atualmente existem diversas marcas de kits de campo para análises de ferro, algumas delas são: Hexis, Alfakit, Hanna, CHEMetrics. A marca Hexis utiliza a metodologia da ferrozina, a marca Alfakit utiliza do tiocianato e a Hanna e a CHEMetrics utilizam a fenantrolina. O kit da marca Hanna não faz distinção das diferentes espécies de ferro, apenas quantifica o ferro total. A escolha do kit da CHEMetrics, neste trabalho, deve-se a dois motivos: 1) a metodologia utilizada de fenantrolina; 2) a capacidade descrita em diferenciar as espécies de Fe.

A CHEMetrics foi fundada em 1969 por Gordon Rampy, para realizar análises em água e água residuária utilizando um dispositivo exclusivo. O diferencial tecnológico dos kits desta empresa é a capacidade de autoenchimento das ampolas com os reagentes. A técnica é inovadora e aumentou muito a simplicidade, a utilidade, a velocidade e a segurança dos testes colorimétricos de água, tanto em laboratório como em campo.

Existem 7 tipos de kits visuais, sendo 5 tipos para análises de ferro total e solúvel e 2 tipos para análise de ferro total e ferro ferroso, todos baseados no método de fenantrolina, descrito no Standard Methods (APHA, 1997).

Segundo a ficha técnica da CHEMetrics (do kit K-6010), o ferro solúvel consiste principalmente de ferro ferroso (Fe II), mas pode conter uma porção pequena de ferro férrico (Fe III). Em ampolas para análise de ferro solúvel existe a presença de cloridrato de hidroxilamina, o qual converte o Fe (III) para Fe (II). Já em ampolas para análise de

ferro ferroso, não ocorre adição de cloridrato de hidroxilamina, e, portanto, estas ampolas não permitem quantificação do Fe (III). Em análises de ferro total é adicionada uma solução de ácido tioglicólico e amônia na amostra, solução esta responsável por dissolver particulados de ferro e converter o Fe (III) para Fe (II). Minérios de ferro como ferrita e magnetita requerem a digestão ácida, segundo instruções do Kit da CHEMetrics, com ácido tioglicólico e tioglicolato de amônio.

A ficha técnica da empresa recomenda que o pH seja ajustado para valores entre 2 a 7 para diminuir os possíveis interferentes, porém não existe a recomendação da filtração em membrana.

3.1.3 Uso da fenantrolina para quantificação de Fe total e Fe (II)

A seguir estão listados alguns trabalhos que utilizaram a fenantrolina para quantificação do ferro total e Fe (II), alguns dos quais apresentam possíveis erros de análise ao utilizar o método para quantificar o Fe (II).

Conforme já descrito por Lee e Stumm (1960), o Fe (III) é um interferente em análises de Fe (II), pois causa instabilidade no desenvolvimento de cor, porém esta informação geralmente é desconsiderada em análises de Fe.

Gjessing (1964) cometeu um erro na análise técnica do método de fenantrolina, na quantificação de Fe (II) presente em amostras de água. Pois segundo Shapiro (1966), a acidificação seguida da fervura da amostra causa a redução do Fe (III) pela matéria orgânica da amostra, o que levou à quantificação do Fe (III) como Fe (II). Ou seja, a matéria orgânica em meio ácido é capaz de atuar como redutora do Fe (III), mesmo que presente somente em pequenas concentrações.

Segundo Ghosh e colaboradores (1967) a filtração em membrana com porosidade 0,45 µm é essencial para remover os interferentes, como precipitados de Fe (II) e Fe (III). Estes pesquisadores descreveram que após a filtração a amostra deve ser acidificada e em seguida o valor de pH ajustado para 4.

Outro trabalho que não cita a faixa do pH da amostra no momento da coleta e da análise é do pesquisador Ivanov e seus colaboradores (2009), que avaliaram a remoção de fosfato de água residuária utilizando bactérias presentes em lodo anaeróbio e minério de ferro como aceptor final de elétrons. Para quantificar o Fe (II) total, 2 mL de HCl foram adicionados a cada 100 mL de amostra logo após a coleta. Também não existe a informação se a amostra foi filtrada. A adição do ácido e a falta de filtração fizeram com que o Fe (III) presente na amostra tenha sido quantificado como Fe (II), pois em

pH ácido o Fe (III) permanece solúvel e o reagente cloridrato de hidroxilamina converte-o para Fe (II).

Acredita-se que o trabalho do pesquisador Gou e seus colaboradores (2010) também estejam equivocados, já que os mesmos citam o trabalho do pesquisador Ivanov como referência para as técnicas de diferenciação e quantificação do Fe. A amostra denominada controle apresentou um aumento constante nas concentrações de Fe (II), atingindo valores próximos aos valores máximos produzidos nos ensaios que continham bactérias (250 mg/L de Fe II). Acredita-se que este resultado deva-se também a adição de ácido e a falta de filtração da amostra, o que permitiu possivelmente conversão do Fe (III) para Fe (II).

Bingjie e colaboradores (2014) também não citaram o valor de pH no momento da coleta da amostra, mas realizaram a filtração em membrana de 0,22 µm após a coleta, quantificando em seguida o Fe (II).

Em seu trabalho, Xu e colaboradores (2014) também adicionaram ácido após a extração do Fe (II) por meio de filtração em membrana de 0,45 µm, seguindo as instruções do Standard Methods (2012). Conforme os resultados obtidos nesta pesquisa, esta porosidade não permite separar as diferentes espécies de ferro em todas as faixas de pH.

Xu descreveu que houve a completa redução do Fe (III) presente no citrato férrico por bactérias redutoras de ferro, porém acredita-se ser este um resultado equivocado, já que não é citado o valor do pH em que foi coletada e filtrada a amostra. Em pH até 4, o Fe (III) passa pela membrana com porosidade 0,45 µm, e o método da fenantrolina pode ter quantificado o Fe (III) como Fe (II), resultado que será debatido nesta tese.

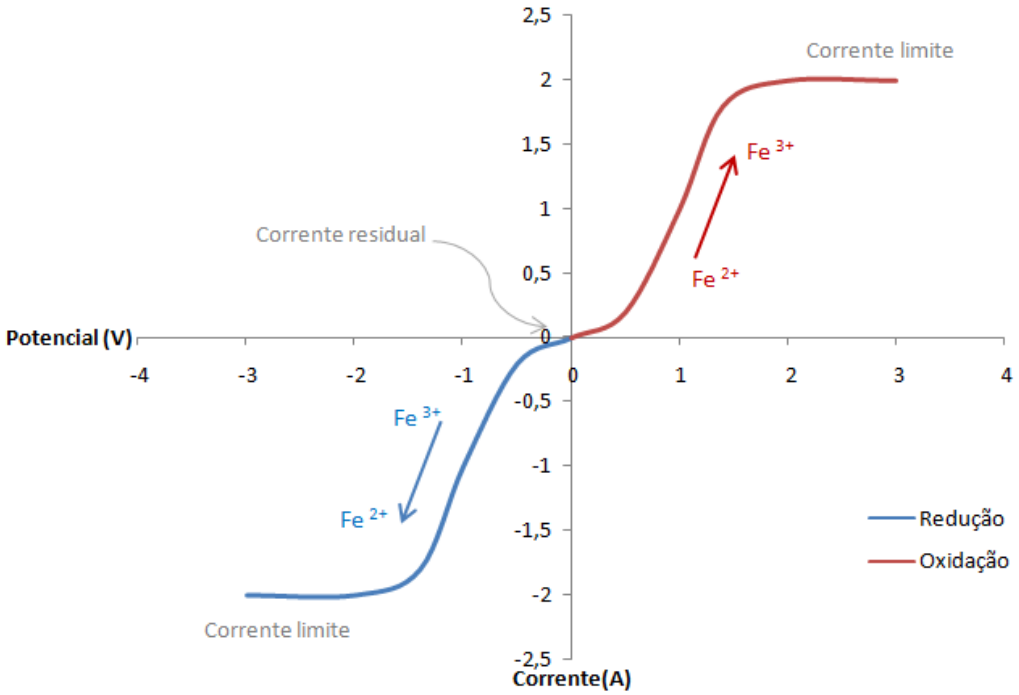
Muitos pesquisadores utilizam o método da fenantrolina para quantificar o íon Fe (II), considerando ser esta a espécie solúvel, e o Fe (III) a espécie insolúvel, porém não mediram o pH no momento da coleta. Além disso, assumem que apenas o Fe (II) atravesse a membrana de 0,45 µm, desconsiderando o valor de pH.

Dada a importância da quantificação correta das espécies de ferro presentes em ambientes em que as bactérias redutoras de ferro atuam, e considerando o risco de interconversão destas espécies de ferro durante os procedimentos de análise, optou-se por reavaliar detalhadamente o método da fenantrolina para quantificação de espécies de ferro.

3.2. Métodos voltamétricos para quantificação de diferentes espécies de ferro

Além dos métodos colorimétricos para quantificar diferentes espécies de ferro, existem também as técnicas eletroanalíticas, como a voltametria que é baseada na intensidade da corrente em função do potencial aplicado. O potencial é aplicado em uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente são registrados simultaneamente, obtendo-se a curva corrente versus potencial (Figura 4). A curva sigmoidal é característica de microeletrodos. A diferença de corrente limite e corrente residual é proporcional a concentração do elemento analisado. O sinal do potencial indica se a reação é de oxidação (sinal positivo) ou redução (sinal negativo).

Figura 4 – Polarograma de microeletrodos.



Fonte: Adaptado de ALEIXO, 2003.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Quantificação de Fe (II) e Fe total por fenantrolina

O método da fenantrolina para determinação de Fe (II) depende da reação da 1,10-fenantrolina com o Fe (II) para formar um complexo alaranjado de intensidade de cor proporcional à concentração do ferro (APHA, 2012).

A solução estoque de ferro com 200 mg/L de Fe (II) foi preparada adicionando-se lentamente 20 mL de ácido sulfúrico concentrado em 50 mL de água ultrapura, e em seguida foi adicionado e dissolvido 1,404 g de sulfato ferroso amoniacal [Fe $(NH_4)_2SO_4.\ _6H_2O$], na mesma solução. Gotas de solução de permanganato de potássio 0,1 Mforam adicionadas até a solução estoque de ferro assumir uma leve coloração rósea, e completou-se o volume para 1000 mL com água ultrapura. Esta solução foi diluída com água ultrapura para obter a solução-padrão de 10 mg/L Fe (II) a partir da qual foram preparados os padrões de calibração nas concentrações 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e 0 ppm.

A solução estoque de cloridrato de hidroxilamina ($NH_2OH.HCl$) foi preparada dissolvendo 10 g do reagente em água ultrapura. O volume foi completado para 100 mL em balão volumétrico após dissolução completa do composto. A solução estoque de acetato de sódio (CH_3COONa) foi preparada dissolvendo 200 g do reagente em um volume final de 800 mL de água ultrapura. A solução estoque de fenantrolina foi preparada dissolvendo 100 mg do reagente em 100 mL de água ultrapura, com agitação e aquecimento a 80°C.

3.2.2 Determinação de *Ferro total*

Ácido clorídrico (50%, 4 mL), cloridrato de hidroxilamina (10%, 1 mL), solução tampão acetato de sódio (10 mL) e fenantrolina (5 mL) foram adicionados nesta sequência a 50 mL de amostra sendo o volume final completado com água ultrapura para 100 mL. Homogeneizou-se a solução e após 10 minutos foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm.

3.2.3 Determinação de *Ferro (II)*

Em 50 mL de amostra foi adicionada a seguinte sequência de reagentes: 2 mL de ácido clorídrico (50%), 10 mL de solução tampão de acetato de sódio e 20 mL de fenantrolina, sendo o volume completado para 100 mL com água ultrapura. A solução foi homogeneizada e após 10 minutos foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (510 nm).

3.2.4 Análise de ferro com o kit CHEMetrics

Foi utilizado o Kit (CHEMetrics – K-6010) para comparar a quantificação do Fe (III) e (II), na concentração de 208 mg/L. Estas medições foram realizadas segundo as instruções do fabricante.

Para análise de Fe (II) foram adicionados 25 mL da amostra em um recipiente plástico do próprio kit. A ampola contendo os reagentes foi introduzida no recipiente que continha a amostra, e a seguir a ponta da ampola foi quebrada. O vácuo existente dentro da ampola puxou um volume predeterminado e fez a amostra entrar em contato com os reagentes. Após 4 minutos foi realizada a leitura do Fe (II) utilizando os comparadores colorimétricos.

Para realizar a quantificação do ferro total é necessário reduzir o Fe (III) para Fe (II). A redução do Fe (III) foi realizada adicionando-se cinco gotas de uma mistura de ácido tioglicólico e amônia na amostra inicial. O processo descrito acima foi repetido, e após 4 minutos foi feita a leitura do ferro total por meio de comparações de cores.

3.2.5 Análise de ferro com potenciostato

A análise potenciométrica foi realizada com um potenciostato/galvanostato da marca Autolab e modelo PGSTAT128 (Eco Chemie, Holanda), operado por meio do *software* NOVA do laboratório de sensores eletroquímicos e métodos eletroanalíticos (LSEME – IQ - USP). As medições foram realizadas com amostras filtradas em membranas de 0,2 μm e dentro de uma célula eletroquímica. Na célula eletroquímica haviaum eletrodo com fio de prata, com uma camada de AgCl, saturado com KCl e um eletrodo inerte de platina. Após a aplicação do potencial, mediu-se a corrente obtida do eletrodo, em ampere (A). A diferença do tempo para a leitura das diferentes amostras foi de 5 minutos.

3.2.6 Análise do ferro total em espectrofotômetro de absorção atômica

A quantificação de ferro total foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com o equipamento Shimadzu, modelo AA-7000 Series (Quioto, Japão), com queimador de ar-acetileno e lâmpada de catodo oco de ferro modelo P826 (Victoria, Austrália). O equipamento foi calibrado com padrões contendo as concentrações de 10; 20; 40; 60; 80 e 100 mg/L de ferro total diluídos em ácido nítrico 5%. Para o branco foi utilizado somente ácido nítrico 5%. O resultado foi expresso em miligramas por litro.

3.2.7 Análise voltamétrica de Fe (II) e Fe (III)

Devido aos interferentes encontrados nas análises em potenciostato com célula aberta utilizou-se a voltametria de pulso diferencial com célula fechada para avaliar se seria possível distinguir as diferentes espécies de ferro.

As análises voltamétricas foram realizadas com o equipamento da marca Metrohm modelo 797 VA Computrace (Suíça, Herisau). A solução de 0,2 mol/L Na_2EDTA em NaOH 0.1 mol/L usada para quantificação de Fe (II) foi preparada dissolvendo-se 7,44 g Na_2EDTA em solução de 0,1 mol/L NaOH em um balão volumétrico de 100 mL, com o volume completado com água ultrapura. A solução de 0,1 mol/L Na_2EDTA foi preparada em balão volumétrico de 100 mL pela dissolução de 3,72 g de Na_2EDTA em água ultrapura. As determinações de Fe (III) foram realizadas com solução de 0,1 mol/L Na_2EDTA. A solução com 0,25 mol/L oxalato de amônio, utilizada como eletrólito suporte, foi preparada adicionando-se 3,55 g de oxalato de amônio mono-hidratado em um balão volumétrico de 100 mL, sendo o pH ajustado para 2 antes de completar o volume com água ultrapura.

A solução padrão de Fe (II) foi preparada pela dissolução de 0,84 g de sulfato ferroso amoniacal no interior de balão volumétrico de 100 mL. A solução de ácido ascórbico foi preparada em balão volumétrico de 250 mL pela dissolução de 0,24 g de ácido ascórbico em água ultrapura livre oxigênio, removido por meio de borbulhamento com gás nitrogênio por 10 minutos. O frasco contendo a solução preparada foi coberto com papel alumínio para proteger da luz.

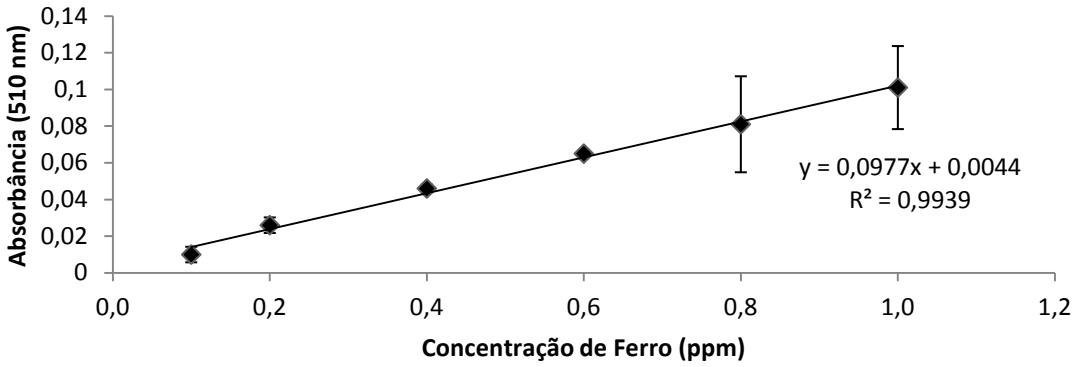
Foi utilizada a solução padrão contendo 1000 mg/L de Fe para obtenção das curvas de pulso diferencial e curva padrão, ambos realizados em triplicata.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Curva padrão para a quantificação de Fe (II) com fenantrolina

A curva padrão para quantificação do Fe (II) foi linear (Figura 5).

Figura 5 – Curva padrão com diferentes concentrações de Fe (II) (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e 0 ppm). Cada medida foi realizada em duplicata.

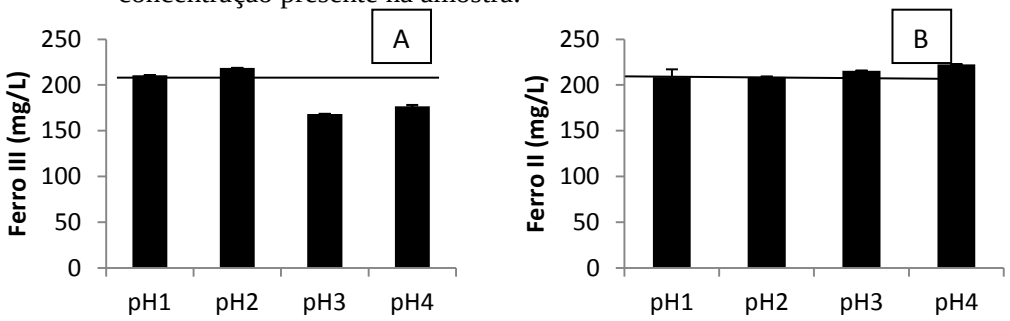


Fonte: ORTIZ, 2018.

3.3.2 Avaliação do método de fenantrolina: reagentes preparados no laboratório

Análises de soluções de cloretos de Fe (II) e de Fe (III) em água ultrapura com o mesmo teor de ferro (208 mg/L de Fe) pelo método da fenantrolina resultaram na recuperação de Fe (III)em pH 3 e 4, com valores menores do que os esperados (Figura 2A). Em pH 1 e 2 foram detectados valores esperados de Fe (III), o que também ocorreu na análise de Fe (II) em todos os pHs analisados (Figura 6).

Figura 6 – Análise de amostras de cloretos de Fe (II) e de Fe (III) em água ultrapura pelo método de fenantrolina. Ensaios realizados em triplicata. A linha refere-se a concentração presente na amostra.



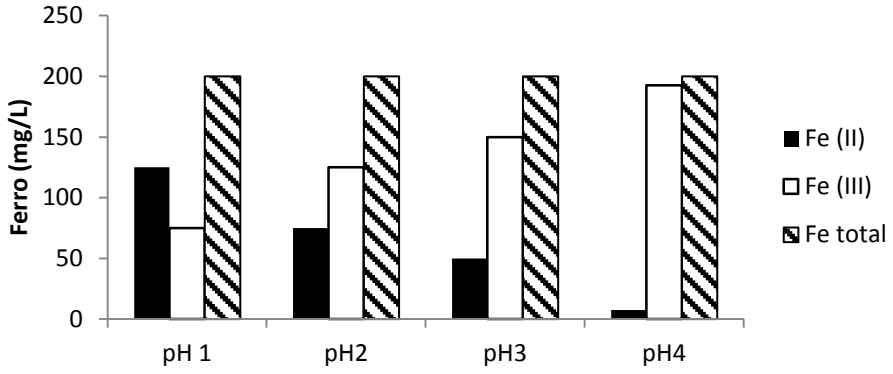
Fonte: ORTIZ, 2018.

3.3.3 Avaliação do método de fenantrolina: reagentes presentes no kit comercial

Usando o kit comercial da CHEMetrics, também baseado no método de fenantrolina, o experimento anterior foi repetido com uma solução de cloreto férrico (208 mg/L Fe).O kit é constituído de ampolas que contêm reagentes pré-quantificados e selados a vácuo, ideal para análises de ferro em campo.

Os resultados demonstram que, em uma solução preparada apenas com Fe (III),os teores de Fe (II)aumentam com o incremento da acidez (Figura 7). Com o aumento dos valores de pH de 2 para 4 as concentrações de Fe (III) aumentaram gradativamente. Em pH=4, a concentração de Fe (III) medida pelo Kit ficou próxima da concentração esperada na solução (concentração de 208 mg/L de Fe III).

Figura 7 – Determinação de Fe total e Fe (II) pelo *Kit* (CHEMetrics – K-6010) em amostras contendo 208 mg/L de Fe (III).



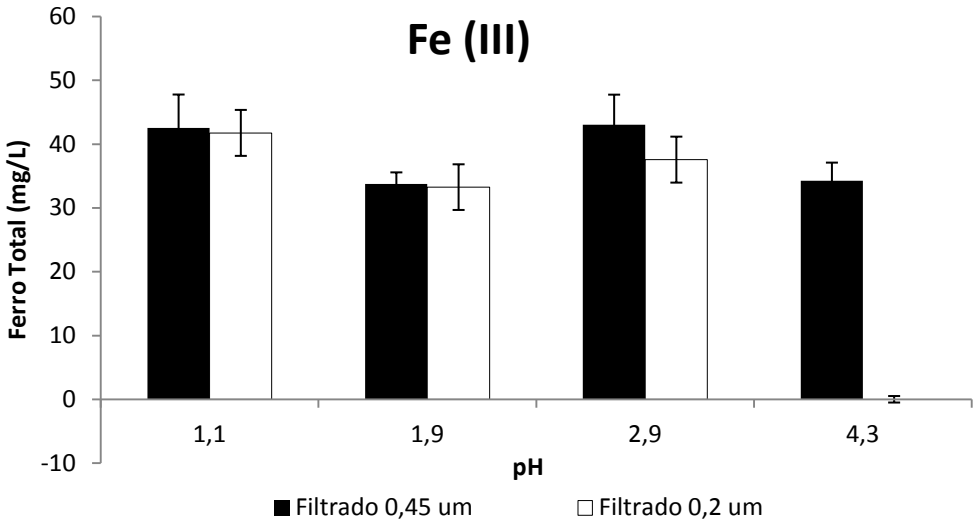
Fonte: ORTIZ, 2018.

3.3.4 Diferenciação das espécies de ferro por filtração

Segundo o Diagrama de Pourbaix (1973) em pH>4 existe a formação de hidróxidos de Fe (III). Devido a esta característica foram realizados ensaios avaliando a diferenciação das espécies de ferro (Fe II e III) por meio de filtração, utilizando membranas de acetato de celulose nas porosidades de 0,2 µm e 0,45 µm.

Amostras com pH entre 1 e 3 filtradas com membranas de 0,45 µm e 0,2 µm apresentaram valores semelhantes de ferro total (Figura 8). Na amostra com pH de 4,3, porém, foi detectada uma quantidade elevada de ferro no permeado da membrana de 0,45 µm, mas nenhum ferro no permeado da membrana de 0,2 µm. Este resultado sugere que o Fe (III) neste pH estava presente na amostra na forma de agregado ou de sólido com diâmetro > 0,2 µm e < 0,45 µm.

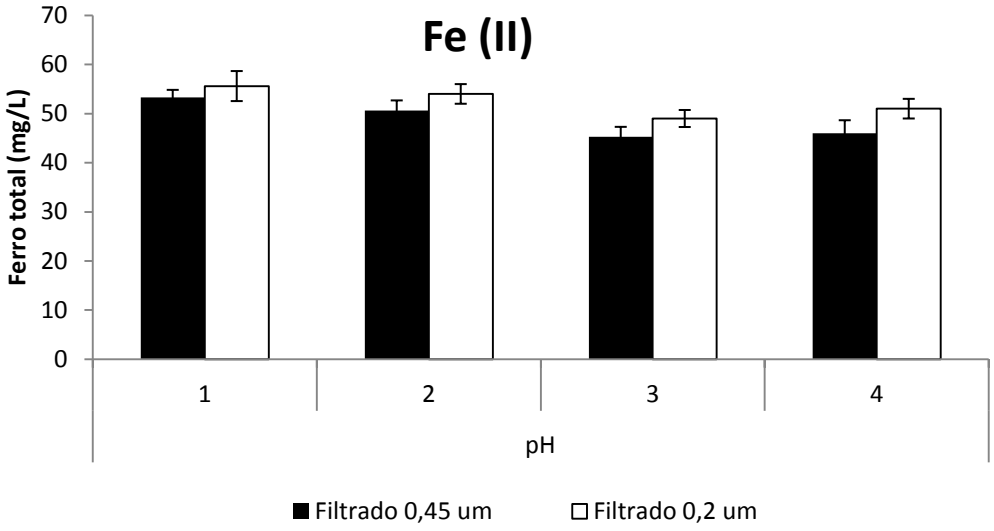
Figura 8 – Concentração de Fe total analisado por espectroscopia de absorção atômica no filtrado de amostras de 50 mg/L $FeCl_3$ puro dissolvido em água ultrapura em diferentes pHs filtradas com membranas de 0,2 e 0,45 µm. Realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Em amostras que continham apenas Fe (II), não ocorreu alteração da concentração de ferro total após a filtração em membranas de 0,2 e 0,45 µm (Figura 9) confirmando que o Fe (II) permaneceu solúvel em soluções menos ácidas (pH = 4).

Figura 9 – Concentração de Fe total analisado por espectroscopia de absorção atômica no filtrado de amostras de 50 mg/L $FeCl_2$ puro dissolvido em água ultrapura em diferentes pHs filtradas com membranas de 0,2 e 0,45 µm. Realizado em triplicata.

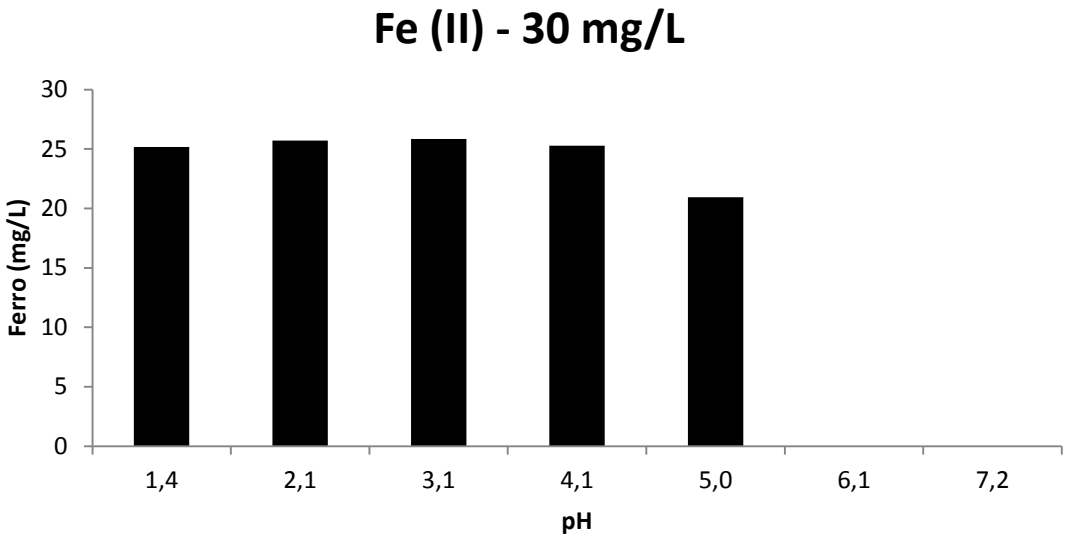


Fonte: ORTIZ, 2018.

Em ensaios de retenção de Fe (II) em membranas de 0,2 µm em diferentes pHs, a totalidade do ferro da solução foi recuperada no permeado em pH < 4 (30 mg Fe

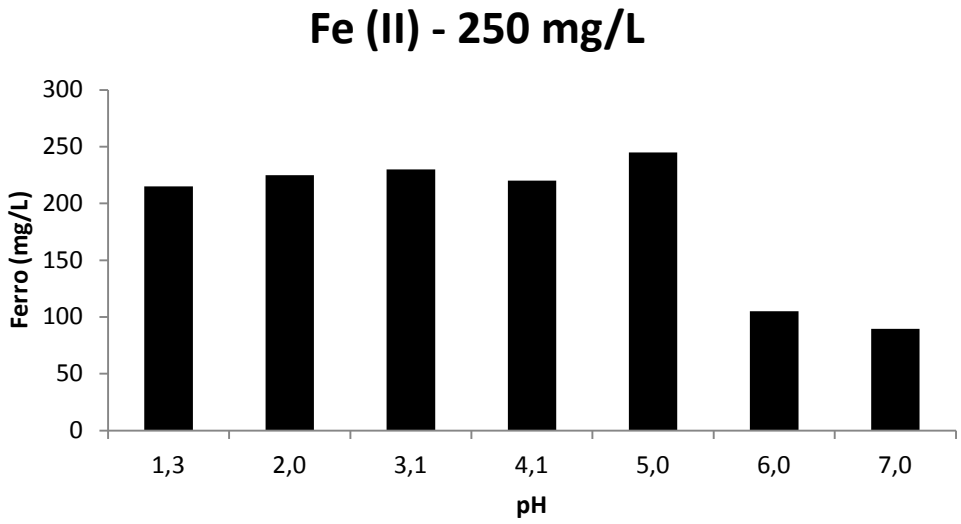
(II)/L, Figura 10) e pH <5 (250 mg Fe (II)/L, Figura 11). Ocorreu a retenção total do ferro em pH > 6 em amostras com 30 mg Fe (II)/L e quase total para amostras com 250 mg Fe (II)/L. Ensaios análogos com soluções de Fe (III) produziram boa recuperação de ferro em filtrados somente abaixo de pH =2 (30 mg Fe (III)/L, Figura 12) ou pH =3 (250 mg Fe (II)/L, Figura 13).

Figura 10 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_2$ (30 mg/L). Análise por espectroscopia de absorção atômica.



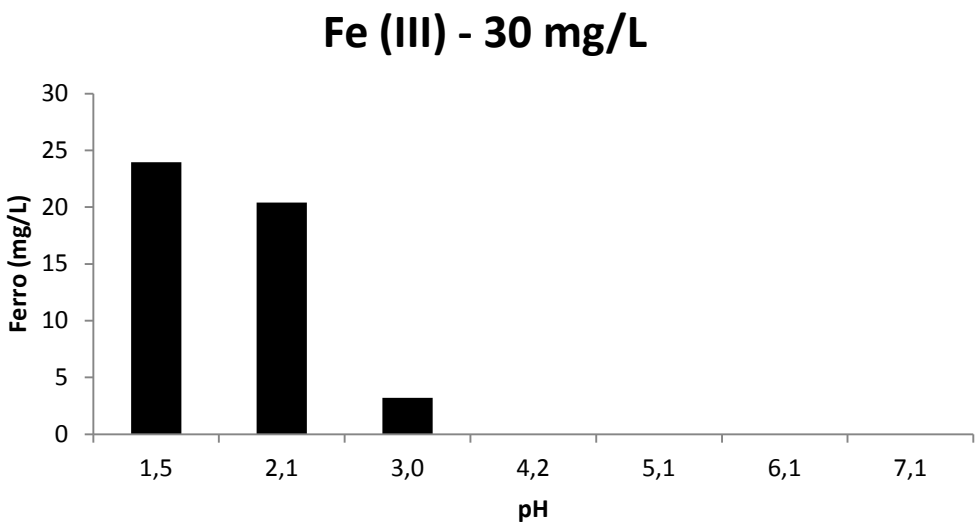
Fonte: ORTIZ, 2018.

Figura 11 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_2$ (250 mg/L). Análise realizada por espectroscopia de absorção atômica.



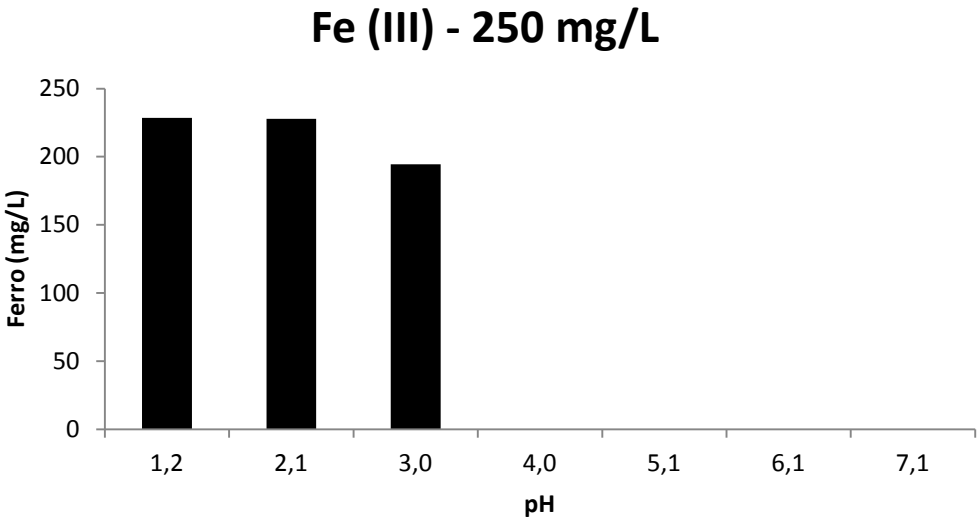
Fonte: ORTIZ, 2018.

Figura 12 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_3$ (30 mg/L). Análise realizada por espectroscopia de absorção atômica.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Figura 13 – Impacto do pH da solução sobre a concentração de Fe total em filtrados de membranas de 0,2 µm de amostras contendo $FeCl_3$ (250 mg/L). Análise realizada por espectroscopia de absorção atômica.



Fonte: ORTIZ, 2018.

3.3.5 Formação de hidróxidos

A formação de hidróxidos em solução contendo $FeCl_3$ (50 mg/L) foi visível a olho nu em valores de pH =3 e 4 (Figura 14). Os depósitos de hidróxidos de ferro foram maiores em pH =4. Já nos valores de pH mais ácidos (1 e 2) as amostras permaneceram

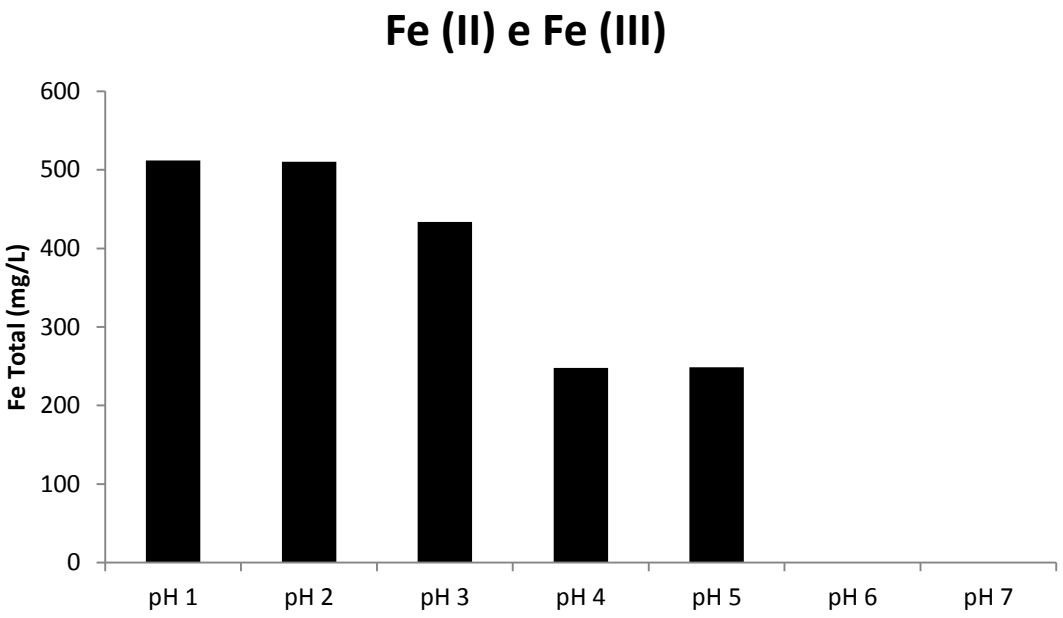
transparentes e sem formação de hidróxidos, confirmando que o Fe (III) em valores de pH = 1 e 2 permaneceu solúvel.

Figura 14 – Fotografia das amostras contendo Cloreto Férrico ($FeCl_3$ – 50 mg/L) em diferentes valores de pH (1, 2, 3 e 4).

Fonte: ORTIZ, 2018.

Como os resultados anteriores indicaram ser possível realizar a separação das espécies Fe (II) e Fe (III) por meio da filtração, realizou-se um experimento de análise de mistura contendo 250 mg/L de Fe (II) e 250 mg/L Fe (III). Apenas em pH 4 e 5 o Fe (II, 250 mg/L) permeou pela membrana (Figura 15). Em soluções com pH de 6 e 7 todas as espécies de ferro foram retidas na membrana. Em pH 1 e 2 não ocorreu retenção de Fe (II) e Fe (III) na membrana.

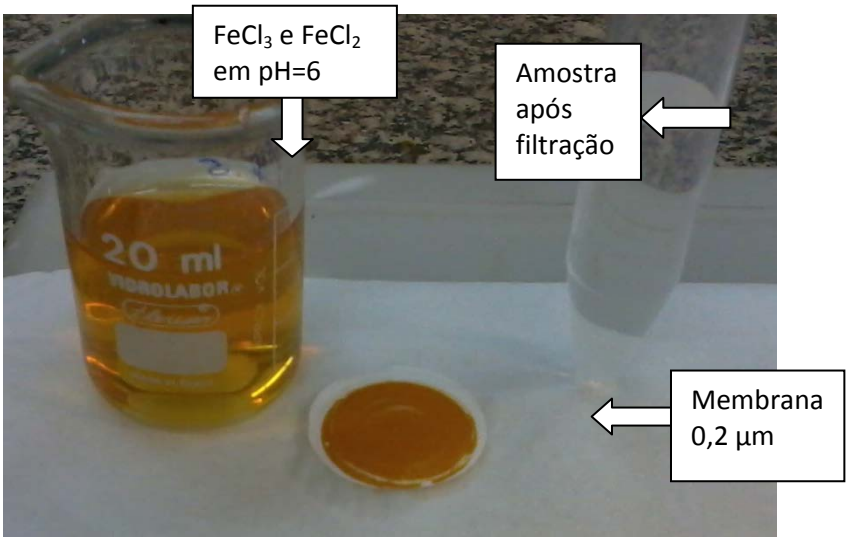
Figura 15 – Concentração de Fe total em amostras contendo a mistura de $FeCl_2$ e $FeCl_3$ (ambos na concentração de 250 mg/L, diluídos em água ultrapura) quantificado por espectroscopia de absorção atômica. Amostras após a filtração em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A análise visual comprova a retenção da totalidade do ferro da amostra em solução com pH = 6 (Figura 16), na concentração de 50 mg/L.

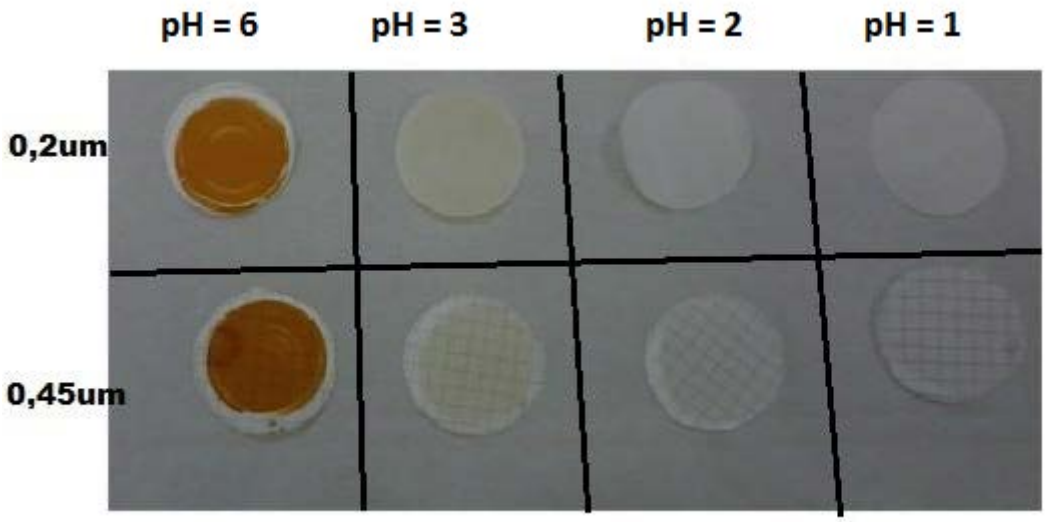
Figura 16 – Fotografia do resultado obtido antes e depois da filtração em membrana de acetato de celulose, com porosidade de 0,2 µm. A amostra continha as duas diferentes espécies de ferro (Fe II e Fe III), na concentração de 50 mg/L e em pH = 6.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A retenção de partículas de Fe (II) e Fe (III) nas membranas 0,2 e 0,45 µm não é visível em amostras com pH 1 e 2. Para pH > 3 já se observa a coloração laranja nas membranas, cor característica do ferro oxidado, coloração que se torna intensa em pH = 6 (Figura 17).

Figura 17 – Resultado do ensaio de filtração em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,2 e 0,45 µm. A amostra continha $FeCl_2$ e $FeCl_3$ (na concentração de 50 mg/L de Fe), em diferentes valores de pH (1, 2, 3 e 6).

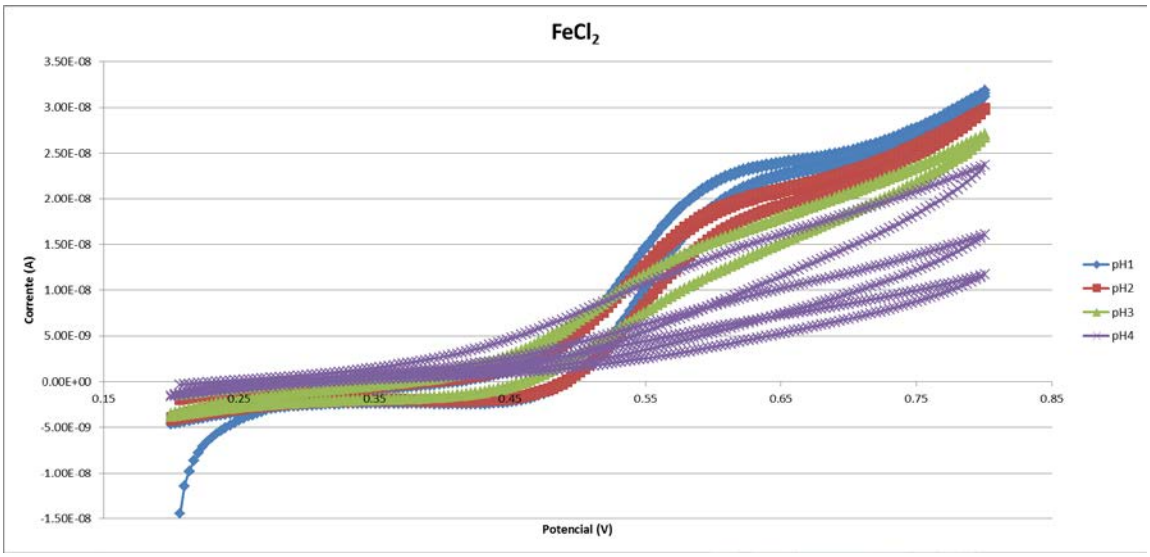


Fonte: ORTIZ, 2018.

3.3.6 Análise em potenciostato

Os perfis voltamétricos cíclicos de amostras contendo $FeCl_2$ foram semelhantes em valores de pH 1, 2 e 3. Nas amostras de pH =4, porém, ocorreu um nítido achatamento do perfil (Figura 18).

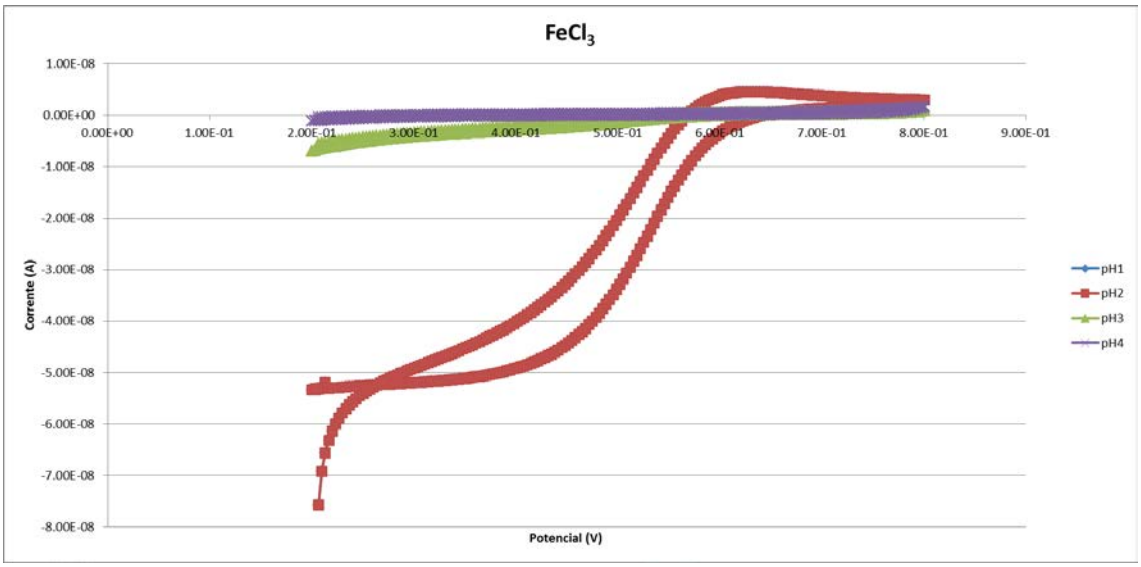
Figura 18 – Voltamogramas de soluções de $FeCl_2$ (50 mg/L diluído em água ultrapura) em pH 1, 2, 3 e 4 após a filtração em membrana de acetato de celulose 0,2 µm.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Os voltamogramas de soluções de Fe (III) filtradas indicam que ocorreu passagem de Fe (III) pelas membranas em pH 1 e 2, mas que parte significativa do Fe (III) ficou retido em pH 3 e 4 (Figura 19). A curva do pH =1 está sobreposta com a do pH =2, ambos formam uma curva de histerese.

Figura 19– Determinação de Fe (III) em potenciostato após a filtração em membrana de celulose 0,2 µm. Foi avaliado o comportamento do Fe (III) em diferentes valores de pH (1, 2, 3 e 4).



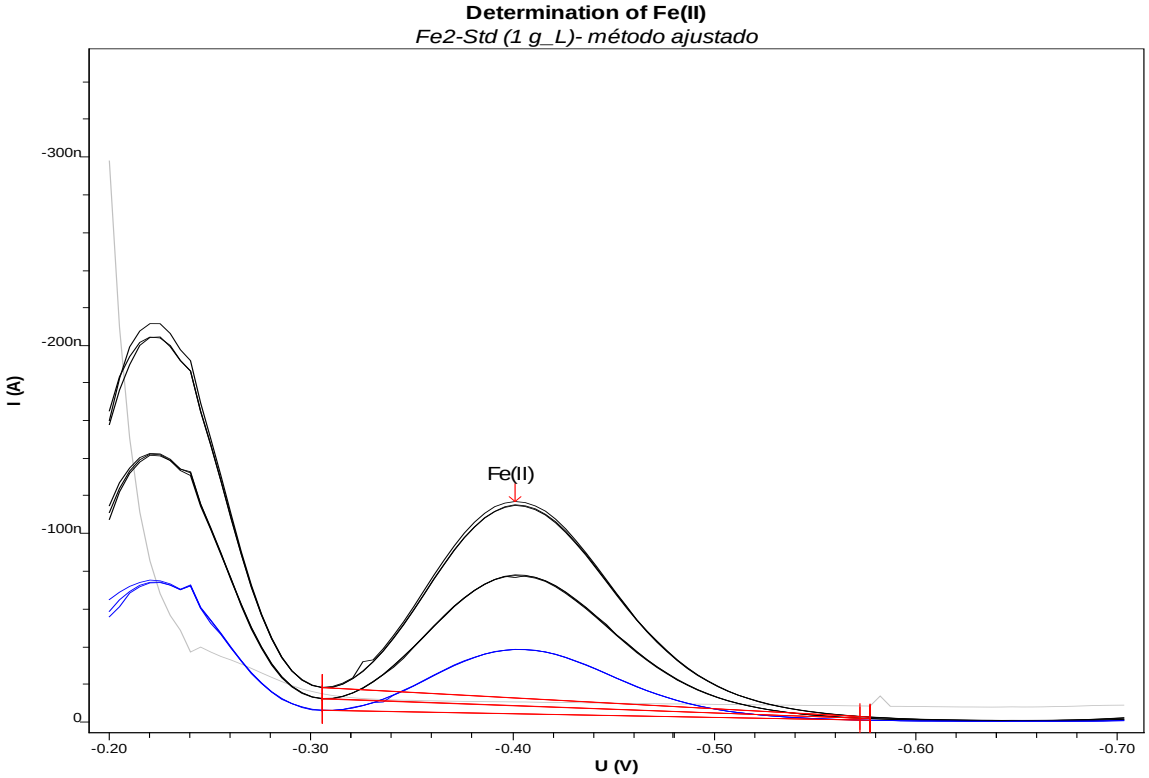
Fonte: ORTIZ, 2018.

3.3.7 Análise voltamétrica de Fe (II) e Fe (III)

Inicialmente foram realizadas duas curvas de calibração para o ferro total e o Fe (II). A curva para obtenção do pulso diferencial e a curva com adição de diferentes concentrações do padrão, possuem ambas a finalidade de avaliar a sensibilidade do equipamento. A curva de pico apresenta valores específicos de corrente versus potencial para os diferentes elementos analisados. A curva com adição de diferentes concentrações serve para avaliar a linearidade da curva padrão. Os resultados foram obtidos diretamente do software do equipamento que realiza o cálculo da concentração do analito na amostra automaticamente. O valor do branco foi descontado no final de cada medição executada neste experimento.

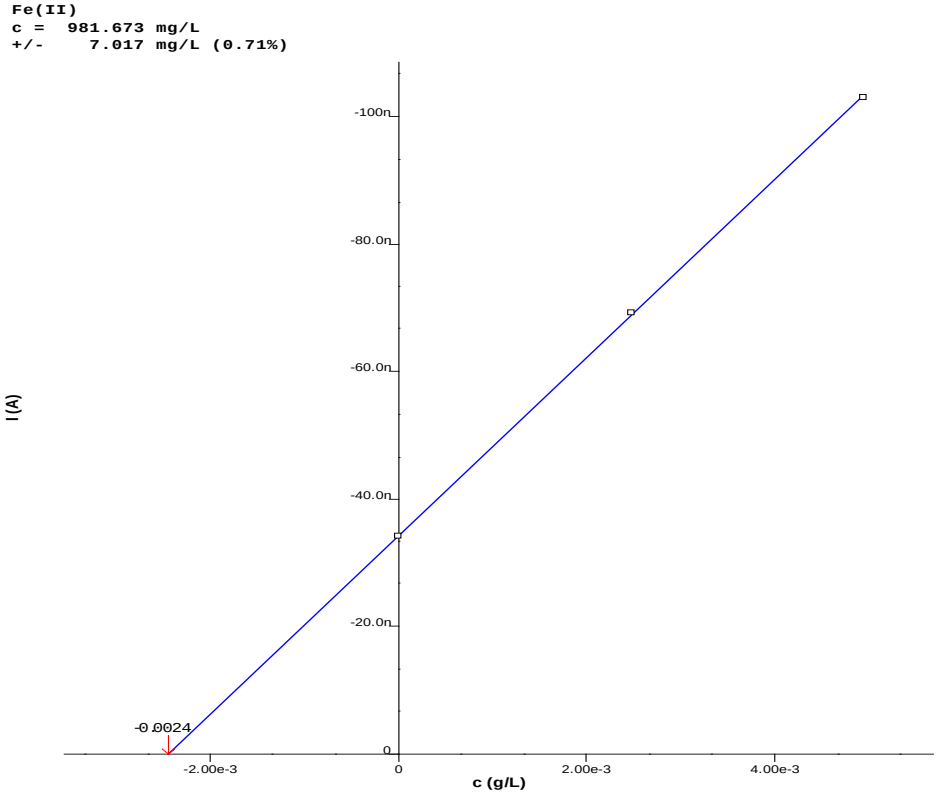
Os resultados confirmam que a voltametria de pulso diferencial apresenta grande sensibilidade para análises de Fe (II) e ferro total, conforme apresentado nas Figuras 20, 21, 22 e 23.

Figura 20 – Curvas de pulso diferencial obtidas na determinação do padrão de Fe (II), na concentração de 1000 mg/L.



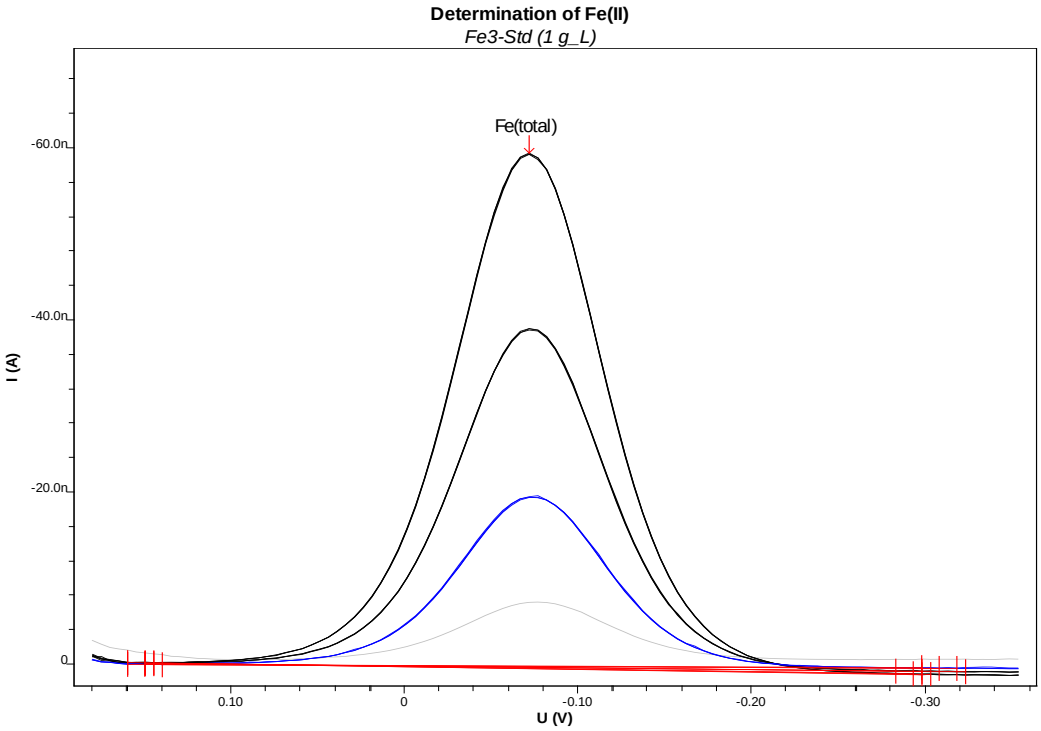
Fonte: ORTIZ, 2018.

Figura 21 – Curva padrão de Fe (II) com adições de 0,05 mL.



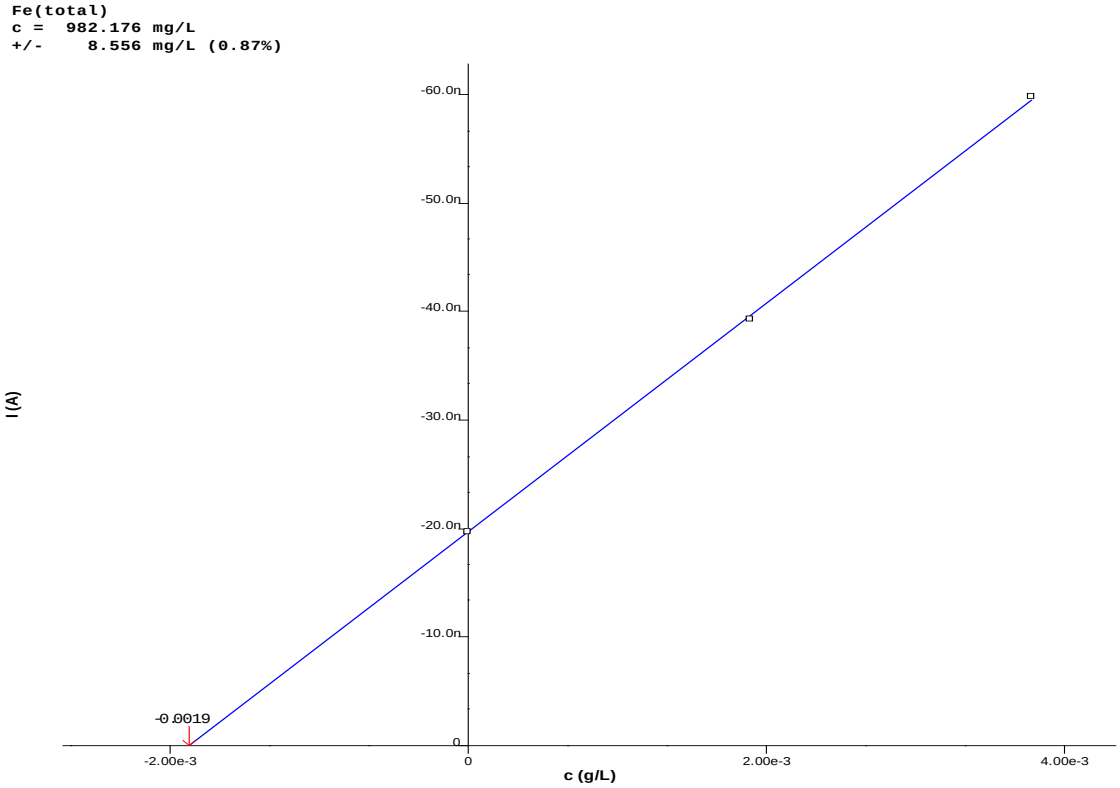
Fonte: ORTIZ, 2018.

Figura 22 – Curvas de pulso diferencial obtidas na determinação do padrão de Fe (III), na concentração 1000 mg/L.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Figura 23 – Curva padrão de Fe (III) com adições de 0,05 mL.



Fonte: ORTIZ, 2018.

As concentrações obtidas para os padrões de Fe (II) e Fe (III) na concentração de 1000 mg/L foram de 981,7 mg/L para Fe (II)e 982,2 mg/L para Fe (III), resultados considerados muito satisfatórios.

Leituras em voltametria de pulso diferencial foram capazes de diferenciar e quantificar as espécies de Fe (II) e Fe (III) em microcosmos anaeróbios, e em diferentes valores de pH e meios de cultivo.

3.4 DISCUSSÃO

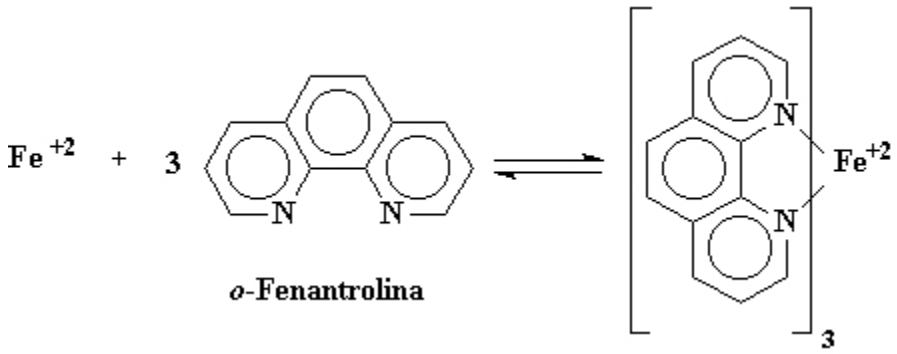
3.4.1 Interferência do Fe (III)

Os teores de Fe (III) não foram quantificados corretamente pelo método de fenantrolina para todos os valores de pH, mas funcionou perfeitamente para amostras que continham somente o Fe (II). Como a lista de interferentes do Standard Methods (2012) não cita o Fe (III), apenas informa que este se encontra solúvel em valor de pH muito baixo, foi necessária a avaliação detalhada da interferência desta espécie de ferro

no método, principalmente porque em amostras ambientais as duas espécies de ferro frequentemente ocorrem juntas.

Em solução com pH entre 3,2 a 3,3, três moléculas de 1,10-fenantrolina se associam a cada íon de Fe (II) formando um complexo laranja-avermelhado (Figura 24), cuja intensidade de cor obedece a Lei de Beer no comprimento de onda de 510 nm (STANDARD METHODS, 2012). Esta lei relaciona simultaneamente, a quantidade de luz absorvida ou transmitida pela concentração do soluto e da espessura da solução, o que possibilita a quantificação do elemento analisado.

Figura 24 – Ilustração da formação do complexo de Fe (II) com a fenantrolina.



Fonte: BREITKREITZ *et al.*, 2014.

Para quantificar o ferro com a fenantrolina é necessário que o ferro esteja reduzido na espécie de Fe (II), pois segundo Walczak e Flynn (1998) o complexo entre fenantrolina e Fe (III) não é estável. O cloridrato de hidroxilamina é um agente redutor incorporado nos ensaios para reduzir o Fe (III) para Fe (II). A interferência de Fe (III) na quantificação de Fe (II) não foi devida à qualidade dos reagentes preparados em laboratório, pois a mesma interferência foi constatada em quantificações com o kit. O kit, que também se baseia no método de fenantrolina, acusou a presença de Fe (II) em amostras que continham somente Fe (III). Verificando a composição dos reagentes presentes na ampola, constatou-se que a mesma possuía também o cloridrato de hidroxilamina. Portanto, é necessário separar as duas espécies de ferro antes de realizar a leitura, seja utilizando o kit ou os reagentes preparados em laboratório.

3.4.2 Filtração

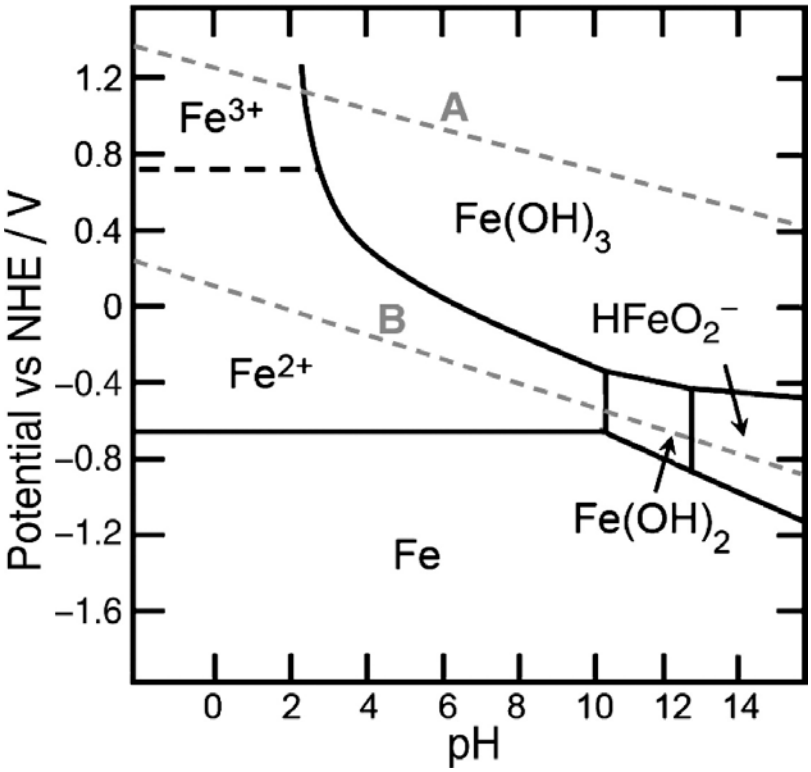
O método da filtração foi utilizado na separação das espécies de ferro. O Standard Methods (2012) não possui muitas informações acerca da faixa de pH em que o Fe (III) é um interferente, o que levou à necessidade de realizar ensaios para verificar

se as duas espécies de ferro ficariam retidas em membranas em diferentes valores de pH, tomando por base que o próprio Standard Methods (2012) afirma ser possível separar o ferro solúvel e o coloidal das demais espécies de ferro em membrana com porosidade 0,45 µm.

Os resultados foram positivos em membranas de acetato de celulose com porosidade 0,2 µm e para os valores de pH entre 4 e 5, dentro dos quais foi possível separar as espécies de ferro por meio da filtração. Estas análises encontram-se de acordo com o diagrama de Pourbaix (1973, Figura 25), segundo o qual o Fe (III) é insolúvel em pH acima de 4, enquanto o Fe (II) é solúvel entre pH de 0 a 10, possibilitando a diferenciação das duas espécies de ferro por meio da filtração.

Conclui-se que a separação das espécies de ferro é possível se o valor de pH for entre 4 e 5 e a amostra for filtrada em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm. Este procedimento, no entanto, precisa ser realizado no exato momento da coleta, pois o Fe (II), em contato com oxigênio, sofre oxidação, passando para a forma de hidróxidos.

Figura 25 – Diagrama de Pourbaix de Fe – H_2O.



Fonte: POURBAIX, 1973.

As membranas além de servirem de barreiras físicas, possuem propriedades químicas na superfície (se não forem quimicamente inertes). Estas propriedades são

capazes de gerar reações químicas que afetam a retenção de ferro, por meio de adsorção e interações químicas. Utilizando membrana de cerâmica com pH > 4,5 são retidos 90% do Fe (III), retenção esta dependente da composição da solução e das formas em que se encontra o Fe (III) (RATKO *et al.*, 2012).Quanto maior for o tamanho e a quantidade de colóides de hidróxidos férricos maior será a retenção (RAT'KO *et al.*, 2012). A hidrofilicidade e a porosidade de membranas de acetato de celulose são responsáveis por reter metais pesados, como cádmio, zinco e níquel (MORADIHAMEDANI e ABDULLAH, 2017). Membranas de acetato de celulose estão sendo utilizadas em tecnologias de filtração de osmose reversa e ultrafiltração (QIN *et al.*, 2003).

Confirmada a possibilidade de realizar a filtração para separar as espécies de ferro em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm, as quantificações de ferro podem ser realizadas utilizando o kit, pois em campo este possui como benefícios a praticidade e a rápida produção de resultados.

3.4.3 Oxidação

A taxa de oxidação é dependente do valor de pH e da composição do meio. De acordo com Gunnards e colaboradores (2002) a taxa de oxidação do Fe (II) mais lenta foi obtida com água doce de lago com pH variando de 7,3 a 7,8(tempo de meia vida de 7 horas) e a taxa de oxidação mais rápida foi obtida em água do mar salobra com pH de 7,6 a 8,1 (tempo de meia vida 20 minutos) ambos com salinidade de 6% e purgados com nitrogênio. Segundo Barry e colaboradores (1994) em água destilada autoclavada a concentração de Fe (II) permanece constante, na temperatura de 18ºC. Os mesmos autores confirmaram que na presença de luz do solo corre a oxidação do Fe (II) em suspensão. Foi possível visualizar a olho nu a formação de hidróxidos de ferro. Segundo De Souza (2007) a coloração laranja nas membranas após a filtração é característica do ferro que, ao entrar em contato com o ar, oxida e sedimenta em forma de óxido ou hidróxidos de ferro.

3.4.4 Potenciostato

Por terem sido encontrados interferentes nas análises de quantificação colorimétrica de ferro, optou-se por realizar nova leitura, desta vez em potenciostato, para avaliar as concentrações reais das diferentes espécies de ferro. Esta escolha foi

baseada na sugestão de Lee e colaboradores (1960), para quem o potenciostato constitui excelente técnica para quantificar e diferenciar as espécies de ferro.

A presença ou ausência das espécies de ferro (Fe II e Fe III) após a filtração em membrana de acetato de celulose na porosidade 0,2 µm foi avaliada utilizando a voltametria cíclica.

Nestas análises houve variações nos valores da corrente, variação esta ocorrida devido ao valor de pH utilizado: pH =4. Em soluções menos ácidas, o oxigênio reagiu mais rapidamente com o Fe (II), convertendo-o para hidróxido de Fe e alterando o valor de corrente limite. Esta observação foi confirmada por Morgan e Lahav (2007), cuja pesquisa sobre impacto do pH da solução na formação de hidróxidos de ferro descreve que a cinética de oxidação do Fe (II) pelo oxigênio depende do valor de pH. Partindo do pH = 4, no qual a forma mais comum é Fe (II), a concentração desta espécie de ferro diminui gradativamente conforme o pH aumenta, ao mesmo tempo que aumenta a concentração de $FeOH_2$. Entre os valores de pH 5 e 8, o $FeOH_2$ é a forma mais comum, e sua concentração aumenta proporcionalmente ao aumento do pH. A partir do valor de pH = 8, a forma de $FeOH_2$ continua sendo a mais abundante, porém sua concentração desvincula-se do valor do pH.

Foram feitas também análises com amostras contendo $FeCl_2$ em valores de pH 1, 2 e 3 utilizando uma série temporal (análises feitas em intervalos de tempo diferentes). A diferença do tempo para cada amostra foi de 5 minutos, o que ocasionou uma pequena diferença da corrente limite. Neste caso, quanto menor a corrente, mais tempo a amostra ficou exposta ao oxigênio. Segundo Bond e Caterford (1971) o oxigênio oxida a amostra, sendo um forte interferente nas análises de polarografia em célula aberta. Para diminuir este erro seria necessário purgar a amostra com nitrogênio, procedimento que não foi realizado no momento da leitura.

3.4.5 Análises voltamétricas de pulso diferencial

Devido à interferência do oxigênio foram realizadas leituras no equipamento de análises voltamétricas de pulso diferencial, em condições anaeróbias. Neste equipamento a análise é realizada fechando a célula e purgando nitrogênio, para diminuir a possível interferência do oxigênio. Os resultados apontaram alta precisão e grande sensibilidade do equipamento. Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitudes iguais são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, sendo a corrente medida antes e após o pulso, o que a torna uma técnica muito sensível (DE SOUZA *et*

al., 2003). Segundo Kumar e colaboradores (2017) a voltametria possui alta sensibilidade para determinar íons de Fe (II) em amostra contendo diferentes metais, tais como Fe (III), K (I), Mg (II), Na (I), Ca (II), Cr (III), Ni (II), Cu (III), Zn (II), Ag (I) e Pb (II). Portanto, para análises de diferenciação de espécies de ferro o equipamento indicado é a voltametria de pulso diferencial. Infelizmente este equipamento ainda possui um elevado custo e depende de infraestrutura laboratorial, o que torna esta técnica inadequada para análises de campo, aplicação para a qual ainda são indicados métodos colorimétricos para quantificação de Fe (II) e Fe (III).

3.4.6 Testes colorimétricos

Na avaliação do método da fenantrolina, seja com os reagentes preparados em laboratório, ou com os reagentes do kit da CHEMetrics, os resultados mostraram-se similares. Entretanto, após realizar a filtração, foi possível verificar que o método de fenantrolina quantificou corretamente as concentrações das diferentes espécies de ferro.

Os ensaios colorimétricos ainda são a forma de análise mais comumente utilizada, pois se trata de uma técnica qualitativa para determinar a presença ou ausência de certas substâncias em uma determinada amostra, apresentando baixo custo, rapidez e fácil reprodução. A reação química é simples e revela a olho nu a presença e a provável concentração do elemento analisado. É uma técnica que não requer muito conhecimento químico, e os procedimentos não exigem um laboratório (CHEMCOM, 2001; MOTA e DI VITTA, 2014).

3.5 CONCLUSÃO

O método colorimétrico de fenantrolina é confiável somente para leituras de amostras que contenham Fe (II), mas não diferencia e quantifica corretamente espécies de Fe (III) em todos os valores de pH. Por meio de filtração é possível realizar a separação das espécies de ferro. Nesta filtração é necessário que a amostra possua valor de pH entre 4 e 5 e seja filtrada em membrana de acetato de celulose, com porosidade de 0,2 µm. Para obtenção das concentrações de Fe (II) e Fe (III) é necessário realizar a leitura em amostras filtradas e não filtradas, pois o Fe (II) passa pela membrana e o Fe

(III) fica retido. Desta forma é possível realizar leituras em campo das diferentes espécies de ferro utilizando testes colorimétricos.

4 CAPÍTULO 2

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 Água Residuária

Sabe-se que um dos grandes problemas relacionados à saúde pública é devido falta de saneamento, principalmente, pela falta de coleta e tratamento de esgotos. Inicialmente serão descritas as características da água residuária e as principais formas de tratamento.

Esgotos domésticos são constituídos por aproximadamente 99,9% de água. A pequena fração restante é composta por sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, assim como microrganismos, e é esta pequena fração que exige a necessidade do tratamento do esgoto.

A característica da água residuária irá variar de acordo com a função à qual ela foi submetida: abastecimento público, limpeza urbana e outros. A composição desta água pode variar também com os hábitos da população, o clima ou a situação social e econômica (VON SPERLING, 2014).

É importante ressaltar que em um projeto de estação de tratamento de esgotos, normalmente, não existe o interesse em se determinar os variados compostos presentes na água residuária. Estes compostos não são analisados devido à dificuldade de realizar a análise em laboratório, e em muitos casos esta análise não é utilizada, seja para projeto da estação, ou seja, para operação envolvida no tratamento. Portanto, muitas vezes, opta-se por utilizar parâmetros indiretos (físicos, químicos e biológicos) que traduzam o caráter ou o potencial poluidor do despejo em questão.

Os parâmetros físicos analisados são: cor, turbidez, odor e temperatura. A cor é uma característica física que indica, muitas vezes, a presença de matéria orgânica, ferro, manganês ou outros compostos provenientes de resíduos industriais e de esgotos domésticos, a unidade de medida é UC (unidade de cor). A turbidez é uma característica que indica a presença de sólidos em suspensão, a unidade de medida é UNT (unidade de turbidez) (METCALF e EDDY, 2015).

A temperatura é muito importante, pois atua diretamente na qualidade da água, pois influência na atividade microbiana, solubilidade dos gases, na velocidade de reações químicas, viscosidade do líquido e outros, a medição é realizada pela intensidade de calor, medida em graus Celsius (ºC).

Já o odor varia de acordo com o tipo de esgoto, apresenta sensação olfativa, característica relacionada à presença de sólidos em suspensão, dissolvidos e gases dissolvidos, como o gás sulfídrico (VON SPERLING, 2014).

Os parâmetros químicos são: sólidos totais, matéria orgânica, nitrogênio total, fósforo, pH, alcalinidade, cloretos, óleos e graxas. Os sólidos totais constituem a fração de inorgânicos e orgânicos, sejam suspensos, dissolvidos e sedimentáveis. Já a matéria orgânica é uma mistura de diversos elementos, sendo eles proteínas, carboidratos e lipídeos. Existem duas formas de determinar a matéria orgânica, a forma indireta e a forma direta. A forma indireta consiste em análises de DBO e DQO. Já a determinação direta é realizada por meio da conversão do carbono orgânico a gás carbônico, chamado de Carbono Orgânico Total (COT).

As formas predominantes de nitrogênio em água residuária são orgânica e amoniacal. Essas diferentes formas correspondem o denominado Nitrogênio Total e são determinadas em amostras de água residuária utilizando o método Kjeldahl (APHA, 2012).

As principais formas encontradas de fósforo em corpos de água são polifosfatos, ortofosfato e fósforo orgânico. Segundo a resolução do CONAMA 430 de 2011, o lançamento deste nutriente deve ser limitado em represas com problemas de eutrofização.

O Potencial Hidrogeniônico (pH) é a concentração de íons hidrogênio, usado para indicar as características ácidas ou básica da água residuária. A medição do pH é importante seja na saúde pública, no tratamento da água (abastecimento), tratamento de esgotos e corpos de água, para evitar a proliferação de algas.

Alcalinidade é utilizada para indicar a capacidade tampão do próprio meio, ou seja, é a resistência as variações de valores do pH. Esta capacidade de tamponamento se deve a presença de bicarbonato, carbonato e íon hidroxila (VON SPERLING, 2014).

Os parâmetros biológicos envolvem os microrganismos, os quais desempenham diversas funções fundamentais na questão da qualidade da água. No tratamento biológico de esgoto, os microrganismos são os principais responsáveis pela conversão da matéria orgânica e inorgânica.

Outro aspecto de grande relevância na qualidade biológica da água é a presença de agentes patogênicos e a possibilidade de transmissão de doenças (VON SPERLING, 2014).

Após o tratamento, o efluente é lançado no rio ou no mar, nas condições descritas pela Resolução CONAMA 430 de 2011. Pois esta resolução dispõe das principais condições, padrões, parâmetros e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos receptores.

4.1.2 Tratamento de Efluentes

As análises físicas, químicas e biológicas são extremamente necessárias para compreender a composição dos efluentes, assim como definir a melhor forma do tratamento. Existem diferentes formas de tratamento, serão descritas sucintamente algumas formas utilizadas atualmente.

O tratamento do efluente é dividido em tratamento preliminar, primário, secundário e terciário.

4.1.2.1 Tratamento Preliminar

É a primeira etapa do tratamento, possui a finalidade de remover os sólidos grosseiros e areia. Este tratamento possui três unidades de tratamento:

- *Gradeamento;*
- *Caixa de areia ou desarenador;*
- *Medidor de vazão*.

O gradeamento é utilizado para remover os sólidos grosseiros por meio de grades, mas também podem ser utilizadas peneiras rotativas, estáticas ou trituradores. A principal função deste tratamento é evitar abrasão nos equipamentos e nas tubulações. Desta forma, evitando a possível obstrução nas tubulações.

Já a remoção de areia é realizada por meio de unidades especiais denominadas desarenadores ou caixas de areia. É uma remoção muito simples, que se utiliza do fato de a areia possuir dimensão e densidade maiores, o que a faz ir para o fundo do tanque (VON SPERLING, 2005).

O medidor de vazão é utilizado para controlar a vazão e manter a velocidade da água residuária nas estações de tratamento.

4.1.2.2 Tratamento Primário

O principal objetivo deste tratamento primário é a remoção de sólidos em suspensão sedimentáveis e sólidos flutuantes.

Após a etapa do tratamento primário a água residuária é encaminhada para os tanques de tratamento primário, a velocidade é reduzida para que ocorra a sedimentação dos sólidos em suspensão, devido à maior densidade dos sólidos.

Segundo Von Sperling (2005), uma parte significativa destes sólidos em suspensão é removida na sedimentação, ocasionando a redução da DBO e favorecendo, de certa forma, a redução de custo do tratamento. Isto é importante porque a DBO não removida nessa etapa (tratamento primário) deverá ser removida no tratamento secundário, o que ocasiona um custo mais elevado no tratamento total.

Graxas e óleos sobem para a superfície, pois possuem uma menor densidade que o líquido circundante, sendo coletados e removidos do tanque.

A adição de coagulantes, como sulfato de alumínio e cloreto férrico, aumenta a eficiência do tratamento primário na remoção de sólidos em suspensão.

4.1.2.3 Tratamento Secundário

O tratamento secundário possui como objetivo a remoção de matéria orgânica, medida na forma de DBO. Esta remoção é realizada pela atividade biológica de diversos organismos (bactérias, fungos, protozoários e outros). Estes organismos convertem a matéria orgânica em material celular e CO_2 em condições aeróbias. Em condições anaeróbias, há também a produção de metano.

Neste tratamento secundário existem diversos tipos de sistemas e unidades, como lagoas de estabilização, disposição no solo, reatores anaeróbios, lodos ativados e reatores aeróbios com biofilme.

4.1.2.4 Tratamento terciário

O objetivo do tratamento terciário é a remoção de compostos que não foram removidos nas etapas anteriores, como: nutrientes, organismos patogênicos, compostos não biodegradáveis, metais pesados, sólidos inorgânicos dissolvidos e sólidos em suspensão remanescente (VON SPERLING, 2014).

4.1.3 CEPT

O Tratamento Primário Quimicamente Assistido (CEPT do inglês Chemical Enhanced Primary Treatment) ou chamado também de Tratamento Primário Avançado (APT) refere-se ao processo que utiliza compostos químicos para remover grande parte dos resíduos presentes na água residuária. Os produtos químicos utilizados no tratamento são geralmente sais metálicos e polímeros na forma de polieletrólitos orgânicos, responsáveis pela coagulação, floculação e precipitação de partículas e sólidos dissolvidos (HE *et al*., 2016).

Os coagulantes mais utilizados em CEPT são sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) e cloreto férrico ($FeCl_3$) (JANG *et al*., 2017; AYOUD *et al*., 2017; HAYDAR e AZIZ, 2009; LIN *et al*., 2017; XU *et al*., 2009). De fato, grande parte dos trabalhos publicados em CEPT é baseada no sal de alumínio como coagulante. Na pesquisa realizada por Xu e colaboradores a concentração de alumínio foi de 10 mg/L, Haydar avaliou de 200 a 240 mg/L e para Ayoud as concentrações avaliadas foram de 40 a 200 mg/L. No caso do $FeCl_3$, as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L na pesquisa de Lin e variaram entre 1,53 e 100 mg/L na pesquisa de Jang. Segundo He e colaboradores (2016), a dosagem do coagulante depende da qualidade da água bruta.

A tecnologia CEPT vem sendo muito utilizada nestes últimos anos em estações de tratamento de águas residuárias, trata-se da melhor opção antes do lançamento no mar e um dos principais motivos é o aumento populacional em grandes centros. Nestes locais, em alguns casos, o tratamento convencional não consegue atender ao aumento da demanda para tratamento (XU *et al*., 2009; HE *et al*., 2016). Segundo Von Sperling (2005) outra grande eficiência da CEPT em tratamento primário de água residuária está na remoção de sólidos em suspensão e DBO.

A adoção do CEPT pode diminuir a infraestrutura das Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs), o qual reduz o custo da construção destas ETEs (CHAGNON e HARLEMAN, 2002).

O tratamento CEPT é capaz de remover grande parte do fosfato, do carbono, dos sólidos e de alguns contaminantes, como metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e ovos de helmintos (HE *et al*., 2016). A porcentagem de remoção é em torno de 90% para os sólidos suspensos e entre 80% e 90% para o fosfato. Um problema enfrentado pelo tratamento CEPT é o aumento do volume do lodo: até 2 vezes mais do que o produzido pelo tratamento convencional primário (XU *et al*., 2009).

Segundo Chagnon e Harleman (2002), o aumento no volume do lodo é devido à maior remoção dos sólidos com a aplicação dos coagulantes.

Segundo Figueiredo e colaboradores, em 2005, cinco municípios adotavam CEPT no Brasil, sendo: Riviera de São Lourenço/SP, Armação de Búzios/RJ, Cabo Frio/RJ, Goiânia/GO e Rio de Janeiro/RJ.

4.1.4 Coagulação química

O processo de coagulação pode ser utilizado como pré-tratamento do esgoto antes do tratamento biológico, com intuito de melhorar a eficácia do tratamento (AMUDA *et al*., 2006). Com a adoção do processo de coagulação na etapa inicial do tratamento, a estação poderá ser mais compacta e possibilitará maiores valores de eficiência na remoção de compostos presentes na água residuária. Este processo de coagulação química é muito utilizado em Estações de Tratamento de Água (ETAs), porém ainda pouco utilizado em Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs).

Em alguns casos, os coagulantes são utilizados para precipitar compostos solúveis e desestabilizar as suspensões coloidais de partículas sólidas, que não foram removidas no tratamento convencional. Estes colóides, na ausência do coagulante, possuem cargas elétricas do mesmo sinal que resultam em uma força de repulsão entre eles, a qual impede a aglomeração e a sedimentação. O papel do coagulante é desestabilizar a suspensão coloidal reduzindo todas as forças repulsivas, desse modo baixando a barreira energética e permitindo que as partículas colidam e se agreguem (TCHOBANOGLOUS *et al.*, 1991).

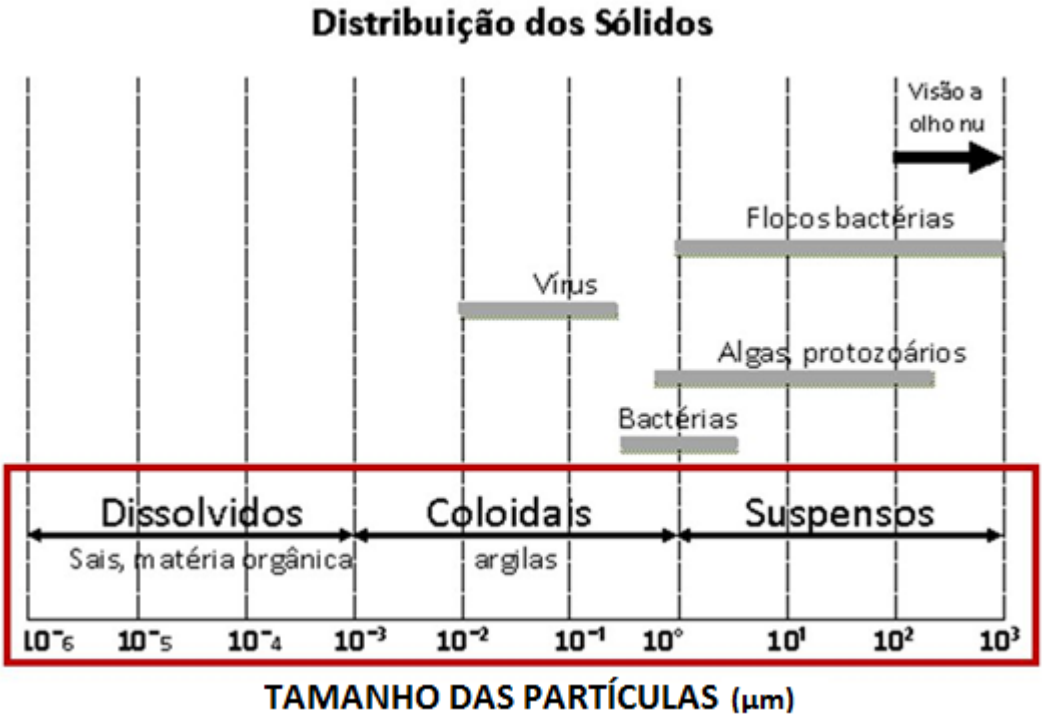
Durante a coagulação processos químicos e físicos contribuem para a formação de flocos. Processos químicos incluem as reações do coagulante e a água para formar moléculas hidratadas com carga positiva. Estas reações dependem da concentração do metal e do valor de pH do meio, após a adição do coagulante. Processos físicos controlam o transporte de espécies hidrolisadas para que ocorra o contato entre as diversas impurezas presentes na água. A agitação lenta gera choques entre as impurezas, e consequentemente, forma agregados com tamanhos maiores, conhecidos como flocos. Os flocos podem ser removidos por sedimentação, flotação ou filtração.

As impurezas ficam separadas no fundo dos decantadores e são chamadas de lodo. A adição de coagulantes aumenta significativamente a quantidade de lodo nos decantadores e o custo com o descarte (XU *et al.*, 2009).

Os coagulantes mais utilizados em ETEs são os sais de alumínio e ferro. Em ETAs os compostos químicos mais utilizados são o sulfato de alumínio, o cloreto férrico e o sulfato férrico (DANDOLINI, 2014). Segundo Pavanelli (2001), o cloreto férrico diminui drasticamente a turbidez, a DBO, os fosfatos e grande parte dos metais pesados (mercúrio, chumbo) ou perigosos para a saúde (arsênio, selênio, bário). Outros trabalhos também confirmam que os sais de ferro atuam na precipitação de fosfato de águas residuárias (GUIMARÃES *et al*., 2015; YANG *et al*., 2014; KEELEY *et al*., 2016; LIN *et al*., 2017).

A Figura 26 apresenta a distribuição das partículas presentes na água segundo o tamanho. São considerados como sólidos dissolvidos as partículas que apresentam diâmetro menor que 10^{-3}µm, os sólidos coloidais que apresentarem diâmetro entre 10^{-3} a 10^{0} µm, e os sólidos em suspensão com diâmetro maior que 10^{0} µm (VON SPERLING, 2014).

Figura 26 – Classificação e distribuição dos sólidos presentes na água em função do tamanho.



Fonte: VON SPERLING, 2014.

4.1.5 Remobilização do coagulante

Uma alternativa para reduzir os custos do tratamento de esgotos é a reciclagem do coagulante. Existem trabalhos onde o coagulante é remobilizado por meio da utilização de compostos ácidos, básicos, solventes orgânicos e quelantes (DANDOLINI,

2014, GUIMARÃES, 2005, OKUDA *et al*., 2014; KEELEY *et al*., 2016). Entretanto, apenas a remobilização ácida é utilizada na recuperação do ferro.

4.1.6 Remobilização ácida

A remobilização utilizando ácido sulfúrico foi adotada em grande escala na década de 1970. Embora seja possível solubilizar o coagulante a base de ferro utilizando ácido, durante o processo são também dissolvidos outros compostos que muitas vezes são tóxicos para saúde humana, como metais pesados (KEELEY *et al*., 2012), sólidos inertes e compostos orgânicos de grande cadeia molecular, responsáveis por gerar a cor da água. Atualmente, para adotar a remobilização ácida, técnicas de filtração vêm sendo utilizadas para remover os compostos indesejáveis (KEELEY *et al*., 2016).

A remobilização de ferro a partir de hidróxido de ferro por via ácida é mais complexa, pois exige um valor de pH mais baixo, e a eficiência máxima de recuperação é em torno de 50%. A redução da espécie de Fe (III) para Fe (II) eleva o valor de pH durante a solubilização, o que torna o processo mais caro devido ao ajuste do pH, realizado com produtos químicos (PIGEON, 1978). Entretanto, Keeley e colaboradores (2016) reportaram que o coagulante recuperado ($Fe_2(SO_4)_3$), na presença de uma pequena concentração do coagulante novo (cru), é eficaz na remoção de fosfato de águas residuárias, apresentando uma boa viabilidade econômica.

4.1.7 Vantagens e desvantagens na remobilização do coagulante

Recuperar o coagulante é uma alternativa viável, pois reduz o volume do lodo a ser descartado. O volume do lodo é proporcional ao gasto do tratamento, ou seja, quanto menor o volume, menor será o custo com o transporte, o tratamento e a disposição final. Segundo Gonçalves e colaboradores (1999) a quantidade de lodo reduzida em sua pesquisa com a regeneração do coagulante foi de 37%, o que possibilitaria a redução do tamanho das unidades de tratamento do lodo.

Estudos confirmam que, para redes de tratamento de água e esgoto de populações de 20.000 e 50.000 habitantes, a regeneração de coagulantes e a sua reutilização em ETA ou ETE é economicamente viável (GONÇALVES *et al*., 1999; XU *et al*., 2009). Existem dois fatores que atuam na redução de custo de uma estação de tratamento: 1) a redução do volume do lodo gerado e 2) a menor quantidade necessária de coagulantes novos, sais ainda não utilizados como coagulantes.

Segundo Xu e colaboradores (2009), a recuperação ácida do coagulante reduziu 35,5% do lodo descartado de CEPT, resultado muito importante, pois no tratamento CEPT a quantidade de lodo gerada é maior quando comparada com o tratamento primário convencional de água residuária. O lodo gerado em uma CEPT chega a ser entre 1,5 a 2,0 vezes maior que no tratamento convencional. O custo do lodo descartado em CEPT chega a alcançar 30-50% do valor anual dos custos operacionais (XU *et al*., 2009). Portanto, a remobilização do coagulante poderia ser uma maneira efetiva de reduzir o volume do lodo, assim como também o custo com coagulantes.

Até o momento só existem trabalhos que utilizam compostos químicos ou físicos capazes de recuperar o coagulante de lodos. Este trabalho é inovador quando se trata na recuperação do coagulante utilizando bactérias redutoras de ferro.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coagulação

4.2.1.1 Água residuária

As amostras de água residuária do CRUSP (esgoto do Conjunto Residencial da Universidade de São Paulo) utilizadas nos ensaios foram cedidas pelo Centro Internacional de Referência em Reuso de Água (CIRRA). Estas amostras já haviam passado por tratamento preliminar: caixa de gordura, gradeamento e caixa de areia. As amostras utilizadas nas análises de composição dos sólidos, pH, turbidez, teor de açúcares e proteínas que não foram analisadas no mesmo dia foram armazenadas em geladeira (4ºC).

4.2.1.2 Ensaios de coagulação em frascos Schott

Em testes preliminares de coagulação foram utilizados frascos *Schott* de 250 mL, avaliou-se os coagulantes à base de ferro, sulfato ferroso ($FeSO_4$), cloreto ferroso ($FeCl_2$) e cloreto férrico ($FeCl_3$) nas seguintes concentrações, (em g/L de Fe): 1; 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 e 0,1. Foram utilizadas barras magnéticas para agitar o conteúdo dos frascos.

A turbidez das amostras foi medida em turbidímetro portátil (HACH 2100P), em intervalos de 5 e 15 minutos, após a adição dos coagulantes. O pH foi medido antes e depois da adição dos coagulantes.

4.2.1.3 Ensaios de coagulação em Jar Test

Os coagulantes avaliados nos ensaios de coagulação em *Jar Test*, realizados no laboratório do CIRRA incluem Cloreto Férrico ($FeCl_3$), Cloreto Ferroso ($FeCl_2$), Sulfato Ferroso ($FeSO_4$) e Sulfato Férrico ($(Fe_2SO_4)_3$). Preparou-se soluções estoques com concentrações de coagulantes padronizadas a 10 g/L de Fe, para todos os coagulantes, e as concentrações testadas nos ensaios de coagulação foram de 1, 10, 20, 40 e 60 mg/L de Fe. Após adição do coagulante, a amostra foi agitada a 120 rpm por 2 minutos para coagulação seguido de 40 rpm por 10 minutos para floculação. Após 10 minutos de repouso foram retirados 15 mL do sobrenadante e realizou-se a leitura da turbidez em um turbidímetro portátil (HACH 2100P). O parâmetro turbidez foi adotado como indicador da eficiência da coagulação do material em suspensão. Em alguns ensaios foram executadas análises adicionais para os seguintes parâmetros: sólidos totais, sólidos voláteis, sólidos fixos, fosfato, carboidratos, proteínas, alcalinidade, nitrogênio orgânico e amônia (APHA, 2012).

4.2.2 Sólidos voláteis totais e sólidos fixos totais

Para quantificação de sólidos voláteis totais (fração de orgânicos) e sólidos fixos totais (fração de inorgânicos), foram adicionados 10 mL de cada amostra em cadinhos previamente tratados em mufla a 550ºC por 30 minutos. Estes cadinhos foram incubados em estufa a 100ºC por 24 horas, em seguida esfriados para temperatura ambiente em dessecador, e posteriormente pesados em balança analítica para determinação da massa dos sólidos totais (ST). Em seguida, estas amostras foram submetidas à calcinação em mufla à temperatura de 550ºC por 20 minutos. As barcas foram novamente esfriadas até a temperatura ambiente em dessecador e pesadas em balança analítica. O peso desta amostra, descontado o peso do cadinho, corresponde ao teor de sólidos fixos totais (SFT) na amostra de água residuária. A massa de partículas orgânicas presentes nas amostras que se volatilizaram na mufla corresponde à diferença entre o peso de ST determinados após secagem e o peso medido após a mufla.

A água residuária bruta foi filtrada em membrana de fibra de vidro (47 mm de diâmetro - Millipore) para quantificar os Sólidos em Suspensão (SS), Sólidos em

Suspensão Fixos (SSF) e Sólidos em Suspensão Voláteis (SSV). Os sólidos em suspensão são as substâncias que, após a filtração e secagem, permanecem retidas na membrana. Os sólidos em suspensão fixos são as substâncias que permaneceram retidas na membrana após a filtração, a secagem e a calcinação em forno mufla de 550ºC. A quantidade de SSV é calculada a partir da subtração do valor de SSF do valor de SS. Os valores foram expressos em mg/L).

4.2.3 Quantificação de fosfato

Para quantificação de fosfato nas amostras, foi utilizado o método do ácido ascórbico (APHA, 1995).

Foram preparadas soluções estoque pela diluição de ácido sulfúrico 6 N (v/v) (≥ 95%, LabSynth Ltda., Diadema, SP, Brasil), molibdato de amônio 2,5 mg/L (≥ 99%, VETEC), ácido ascórbico 10 mg/L (≥ 99%, LabSynth) e ácido clorídrico 0,5N (v/v) (36,5 – 38,0%, LabSynth) em água destilada.

Para confecção da curva padrão utilizou-se fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4, ≥ 98%, LabSynth), nas seguintes concentrações de Pi: 5.0, 2.5, 1.25, 0,625, 0,3125, 0,156, e 0.078 µg/mL obtida através de diluição de solução estoque preparada por diluição de 1 g de NaH_2PO_4 em água deionizada, que foi usada como solução-padrão livre de Pi.

Preparou-se o reagente de trabalho misturando 1 volume de ácido sulfúrico 6 N, 1 volume de 2,5 mg/L de molibdato de amônio, 1 volume de ácido ascórbico 10 mg/L e 2 volumes de água deionizada. Este reagente sempre foi usado imediatamente após o preparo.

As amostras foram transferidas para tubos de ensaio, pipetando-se alíquotas de 1,0 mL de cada amostra, e adicionando-se em seguida 1,0 mL do reagente de trabalho. Os tubos foram tampados com parafilme, misturados no vórtex (marca Phoenix) e incubados em estufa a 37ºC durante uma hora.

Após a incubação, o fósforo foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda 820 nm, utilizando cubeta de polietileno com volume 2 mL.

4.2.4 Quantificação de carboidratos / açúcares

Para a quantificação de carboidratos foi utilizado o método descrito por Dubois (1956). A curva padrão foi preparada com solução estoque de glicose na concentração

de 1 mg/mL. As concentrações utilizadas na curva foram 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ug/mL.

A vidraria utilizada neste ensaio foi deixada de molho por 24 horas em solução contendo peróxido de hidrogênio (3%) e hidróxido de sódio (10 M), e em seguida, foi enxaguada em água ultrapura.

A amostra foi transferida (1 mL) para tubos de ensaio e posteriormente adicionou-se 500 µL da solução fenol (5% - diluído em água ultrapura) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (95% de pureza - Synth).

Os tubos foram mantidos em repouso por 10 minutos na temperatura ambiente antes da análise da absorbância da amostra no comprimento de onda de 490 nm. Utilizou-se água ultrapura para o branco.

4.2.5 Quantificação de proteínas

Proteínas foram analisadas pelo método de Bradford (1976). Para preparo do reagente de Bradford, 100 mg de Coomasie blue G250 foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com álcool 95%. Em seguida, esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L com 100 mL de ácido fosfórico (85%). O volume foi completado com água destilada. Esta solução foi filtrada em filtro Whatman nº1 e armazenada em frasco *Schott*, coberto com papel alumínio e deixado em geladeira até a sua utilização.

Para preparo da curva padrão, 10 mg de BSA foram diluídos em um volume final de 10 mL de água destilada (1 mg/mL de BSA). Volumes de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL desta solução foram transferidos para frascos de vidro de rosca de 20 mL, sendo estas alíquotas completadas para o volume final de 100 µL com água ultrapura. Em seguida foram adicionados 5 mL do corante de Bradford. Após 10 minutos, todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

4.2.6 Alcalinidade por titulação

Para realizar a quantificação da alcalinidade das amostras, utilizou-se o método de titulação com ácido sulfúrico descrito no manual prático de análise de água do Ministério da Saúde e Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2009).

Inicialmente foi preparada a solução indicadora de verde/vermelho dissolvendo 20 mg de vermelho de metila e 100 mg de verde de bromocresol em 100 mL de álcool

etílico 95%. Em seguida, 3 gotas desta solução indicadora foram adicionadas a 50 mL da amostra em um *Erlenmeyer* (com volume de 250 mL).

Preparou-se a solução de titulação com ácido sulfúrico na concentração de 0,02 N, e transferiu-se para uma bureta de 50 mL. Esta solução foi gotejada na amostra até a mudança de cor azul-esverdeada para rosa. Anotou-se o volume gasto de ácido sulfúrico e calculou-se pela fórmula abaixo a alcalinidade da amostra.

Equação 2: *Alcalinidade total em mg/L de* $CaCO_3$ *= Volume gasto de ácido sulfúrico em mL x 20.*

4.3.7 Carbono Orgânico Total (COT)

Carbono Total (CT), Carbono Inorgânico (IC) e Carbono Orgânico Total (TOC) foram determinados no analisador TOC-L (marca Shimadzu, Japão), no qual o carbono orgânico é convertido em CO_2 por combustão catalítica a 680ºC. O CO_2 é analisado em detector de infravermelho não dispersivo (NDIR).

4.2.8 Quantificação de nitrogênio total

Para determinação de nitrogênio total, utilizou-se o método proposto por Kjeldahl (APHA, 2012; GALVANI e GAERTNER, 2006).

O método se baseia na decomposição da matéria orgânica por meio da digestão em meio ácido (ácido sulfúrico concentrado), na temperatura de 400ºC e na presença de sulfato de cobre, que atua como catalisador da reação para conversão do nitrogênio orgânico para nitrogênio amoniacal.

A amostra foi tamponada em pH 9,5 com tampão borato para evitar a hidrólise de tiocianatos e outros compostos orgânicos, e em seguida destilada. Os vapores foram condensados em solução de ácido bórico. A faixa de concentração para esta análise foi de 5 a 100 mg de $N\text{-}NH_2$/L.

4.2.9 Análise de gases

Utilizou-se a Cromatografia Gasosa (GC) - Detector de Condutividade Elétrica (GC – TCD) (marca Perkin Elmer Arnel, modelo Clarus 500, Estados Unidos, Cleveland) para identificar os gases produzidos pelas bactérias no momento da

recuperação do coagulante. O gás de arraste utilizado por este equipamento foi o argônio, com uma coluna empacotada Hayesep DB, nas medidas de 6 pés x 1/8 x 2 mm.

Inicialmente foram realizadas corridas cromatográficas com dióxido de carbono (CO_2) e o metano (CH_4) puros para determinar o tempo de retenção. Após a leitura separada de cada gás, foi analisada a mistura destes dois gases com a finalidade de avaliar se o tempo de retenção permaneceria o mesmo quando analisados conjuntamente. Em seguida, foi analisado o gás produzido pelas bactérias nos ensaios de recuperação do ferro.

4.2.10 Análise de metais no sobrenadante dos ensaios de recuperação de coagulantes

Para avaliar se as bactérias redutoras de ferro também solubilizariam metais presentes no lodo de coagulação, foi realizada a análise dos metais no sobrenadante contendo o ferro recuperado através da Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES Agilent Technologies, modelo 710, Estados Unidos, Califórnia) do laboratório LAREX do Departamento de Engenharia Química. Os metais analisados foram prata, alumínio, ouro, cálcio, cádmio, cobalto, cromo, cobre, índio, magnésio, manganês, sódio, níquel, chumbo, estanho e zinco, expresso em mg/L.

4.2.11 Identificação de microrganismos redutores de ferro em minério de ferro por MALDI-TOF

Inicialmente foram enriquecidas bactérias redutoras de ferro de amostras ambientais, estas bactérias foram mantidas em microcosmos contendo minério de ferro. Três morfotipos diferentes de bactérias presentes em microcosmos foram isolados e identificados por meio da técnica de MALDI-TOF e em seguida por sequenciamento. As bactérias identificadas foram *Bacillus circulans* (identificada por sequenciamento 16S e MALDI-TOF), *Clostridium beijerinckii* e *Klebsiella oxytoca* (estas duas foram identificadas somente com MALDI-TOF). Em seguida, foi avaliada a capacidade destas três bactérias redutoras de ferro em reduzir o Fe presente no lodo coagulado, denominadas de grupo consórcio.

4.2.12 Identificação das bactérias redutoras de ferro por sequenciamento de nova geração

As amostras contendo bactérias redutoras de ferro, provenientes da remobilização do coagulante, foram centrifugadas por 5 minutos na rotação de 6.800 g e na temperatura de 4ºC. Após a centrifugação a amostra precipitada foi utilizada para extração, uma alíquota de 200 mg. Nesta amostra precipitada foi adicionado 30 µL de DEPC, 797 µL de solução contendo espermidina (5 mM de espermidina em 20 mM de Bis-Tris propano em pH=6,9) e 206 µL de solução EDTA na concentração de 500 mM. Esta mistura foi homogeneizada com a ponteira até a dissolução total da amostra precipitada. O homogeneizado foi transferido para tubos de polipropileno com rosca, compatíveis com equipamento Precellys 24 (BertinCorp. – França, Montigny-le-Bretonneux, França), contendo 0,5 gramas de esferas de vidro com 0,2 mm de diâmetro tratadas com DEPC 0,1%, para lisar as bactérias pela técnica de “Beadbeater”. A amostra foi submetida a três ciclos de 45 segundos na potência 4,5 (equivalente a uma rotação de 4500 rpm). Imediatamente após a lise o tubo contendo a amostra foi resfriado em gelo por 1 minuto. A amostra foi concentrada por centrifugação a 10.000 x g, na temperatura de 4°C e por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e dividido em porções iguais para tubos de polipropileno de 2 mL. Foi adicionado 1 mL de Trizol (TRI Reagente, Invitrogen Life Technologies, Brasil). Os tubos foram agitados em vórtex vigorosamente por 2 minutos e aquecidos a 65ºC por 10 minutos. Posteriormente adicionou-se 400 µL de clorofórmio a cada tubo e agitou-se vigorosamente. As amostras foram centrifugadas a 18.000 x g, por 5 minutos e na temperatura de 4°C. Em seguida, a fase aquosa (contendo o RNA) foi retirada cuidadosamente para preservar a fase intermediária e a do fundo. Adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e os tubos foram invertidos manualmente por algumas vezes para a completa homogeneização. A mistura foi mantida sobre a bancada por cerca de 10 minutos. Após esse período a amostra foi centrifugada a 18.000 x g por 5 minutos, na temperatura de 4ºC. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta. Adicionou-se ao precipitado 500 µL de álcool 70% para remover os sais. Homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se a 18.000 x g, na temperatura de 4°C por 5 minutos. O tubo contendo a amostra precipitada foi emborcado em lenço de papel por aproximadamente 3 minutos para secagem. O precipitado foi ressuspendido em água ultrapura e armazenado em freezer a -20 ºC.

4.2.12.1 Tratamento com DNAse

As amostras contendo RNA foram tratadas com Turbo DNA-free™ (Thermo Scientific) de acordo com instruções sugeridas pelo fabricante para a eliminação de qualquer resquício de DNA que porventura possa ter sido coextraído. As quantificações do produto de extração de rRNA e de síntese de cDNA foram realizadas por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260 nm, por meio do equipamento Nanodrop ND-1000, expresso em µg/mL.

4.2.12.2 Purificação do RNA

As amostras de RNA foram purificadas com o kit RNeasy Min Elute Cleanup (Qiagen) de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante.

*4.2.12.3 RT-PCR (***Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction***)***

As reações de transcrição reversa foram realizadas com alíquotas de 2 µg de RNA e processadas de acordo com as instruções sugeridas pelos fabricantes da enzima Super Script III (Invitrogen) com o *iniciador* 909 R (5' CCG TCA ATT YHT TTR AGT 3'; PINTO e RASKIN, 2012).

Na reação de PCR foram utilizados os *iniciadores* para a região hipervariável V3-V5 modificados (338F1 - 5' CCT ACG GGR GGC AGC AG 3', 338F2 - 5'ACW YCT ACG GRW GGC TGC 3', 338F3 - 5' CAC CTA CGG GTG GCA GC 3', 909R - 5' CCG TCA ATT YHT TTR AGT 3'; PINTO e RASKIN, 2012). Essa região foi escolhida por possuir alta correlação filogenética em correlação ao gene rRNA 16S e pelos bons resultados de classificação bacteriana (PINTO e RASKIN, 2012; YOUSSEF *et al*., 2009; HERLEMANN *et al*., 2011; SCHLOSS, 2010). Outra característica que favoreceu a escolha foi por possuir tamanho de sequenciamento compatível com o kit MiSeq Reagent v3, que possibilitou a leitura da região amplificada V3-V5 (571 bp). As reações de PCR foram efetuadas segundo KOTEWICZ (1985), com os seguintes componentes: 2 µL do produto da reação de transcrição reversa foram adicionados a 5 µL de tampão de PCR 10X Invitrogen (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), 1,5 L de $MgCl_2$ (25 mM - Invitrogen), 1 µL de dNTPs (10 mM de cada - Invitrogen), 2 U de Taq Polimerase (Invitrogen), 1 µL de cada iniciador (10 µM – IDT - Integrated DNA Technologies), e água ultra pura (Invitrogen) até o volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). As condições de amplificação empregadas foram: desnaturação a 94 ºC por 30 segundos, anelamento a 62,5 ºC por um

minuto, extensão a 72ºC por 45 segundos, durante 15 ciclos. Ao controle negativo foram adicionados 2 µL de água ultrapura (Invitrogen), para a averiguação da ausência de contaminantes de DNA dos reagentes. O cDNA sintetizado foi analisado por corrida de eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen).

4.2.12.4 Processamento por bioinformática e banco de dados

Foi implementado um pré-tratamento manual utilizando a ferramenta QIIME. Os arquivos foward.fasta e reverse.fasta gerados pelo sequenciamento no MiSeq foram unidos em um único arquivo. Foram testados diferentes valores de similaridade para a região de sobreposição, sendo que o valor de 50% permitiu o pareamento entre as duas sequências sem perda amostral significativa.

4.2.13 Estatística

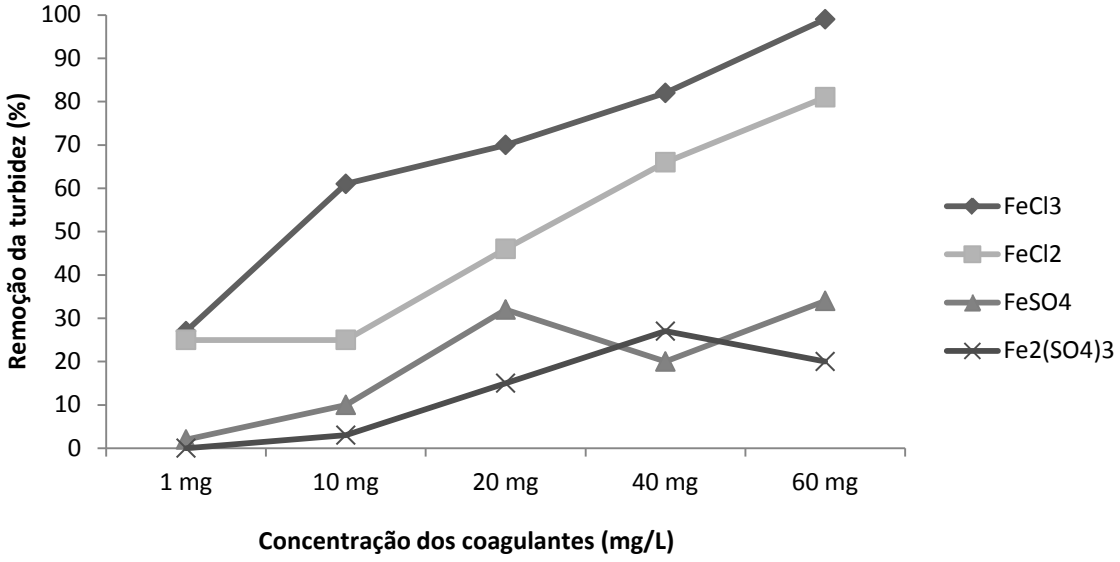
Para avaliar a relevância dos dados foram realizadas análises estatísticas utilizando ANOVA ($p < 0,05$), que foi executado por meio do programa disponibilizado no programa Excel (Microsoft Excel, 2007). Foram considerados valores de F maior que o F crítico, diferentes estatisticamente. A comparação de médias com diferença estatisticamente significativa no teste ANOVA foi realizada pelo o teste Tukey (Oneway, $p < 0,05$), utilizando o software PAST disponível na rede sem custo.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Coagulação

O menor valor de turbidez foi obtido com $FeCl_3$ na concentração de 60 mg/L de Fe (1,63 NTU, Figura 27). A redução de turbidez foi de 99% para $FeCl_3$, de 81% para $FeCl_2$, 33% para $FeSO_4$ e 19% para $Fe_2(SO_4)_3$ na concentração de 60 mg/L de Fe.

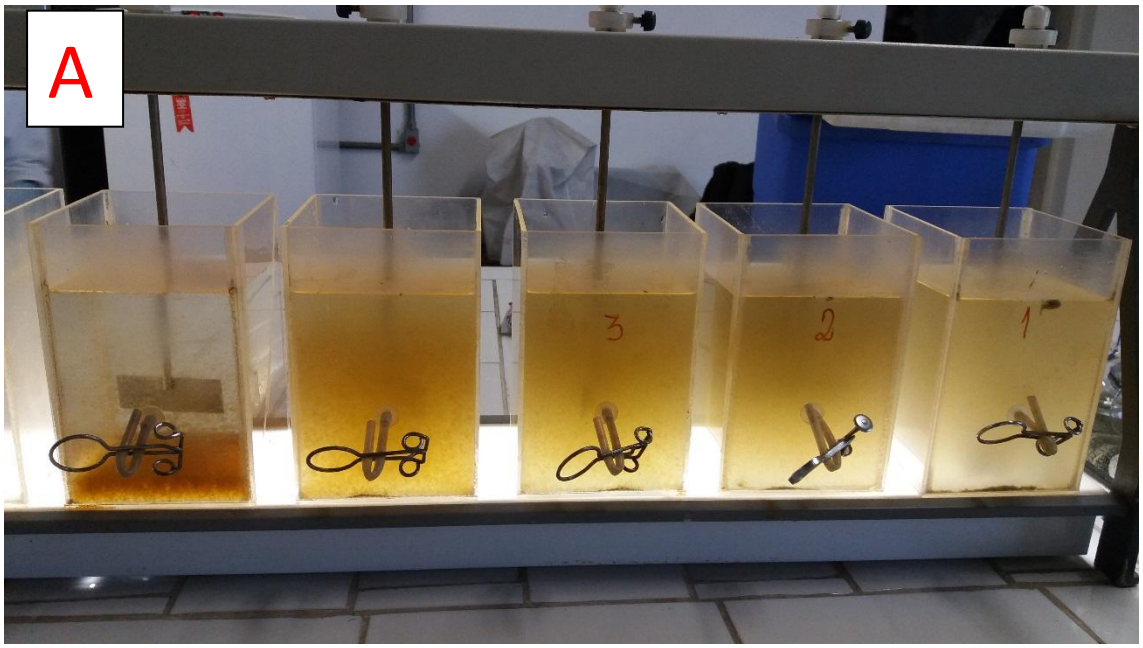
Figura 27 – Remoção da turbidez da água residuária tratada com diferentes coagulantes. Os coagulantes testados foram $FeCl_3$, $FeCl_2$, $FeSO_4$ e $Fe_2(SO_4)_3$. As concentrações avaliadas foram 1, 10, 20, 40 e 60 mg/L de Fe.

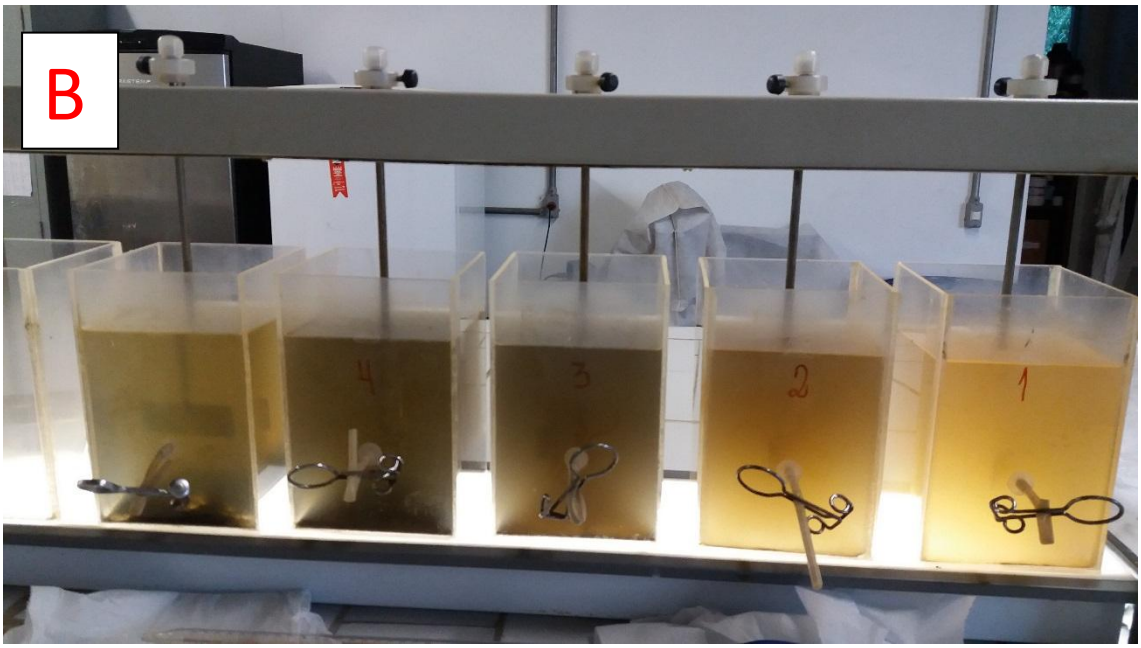


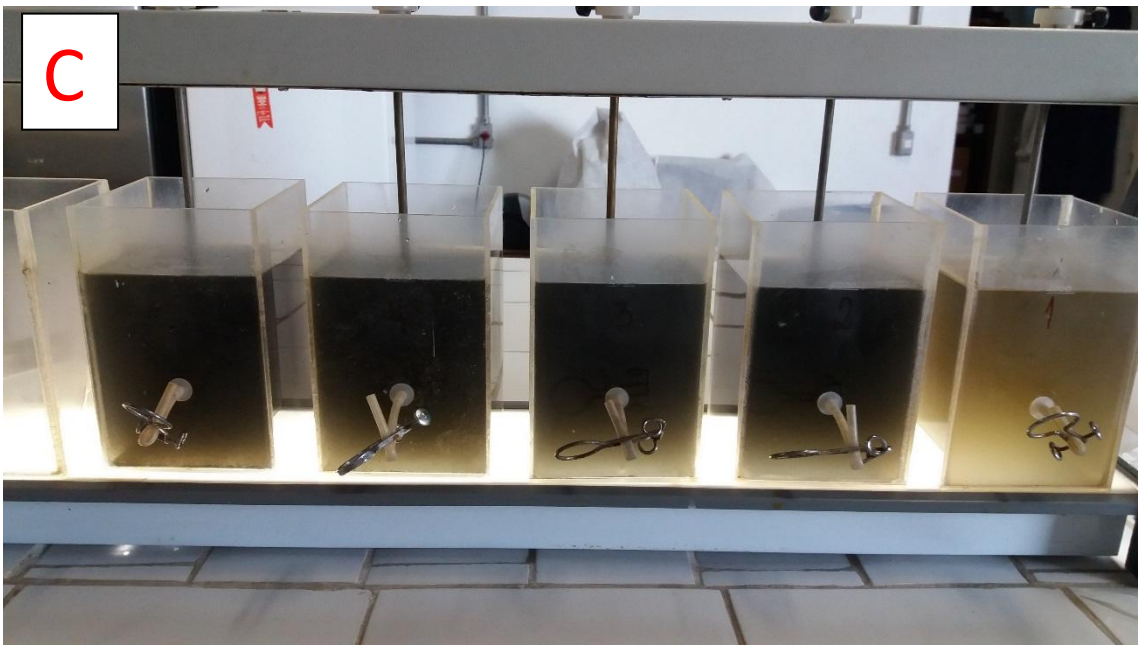
Fonte: ORTIZ, 2018.

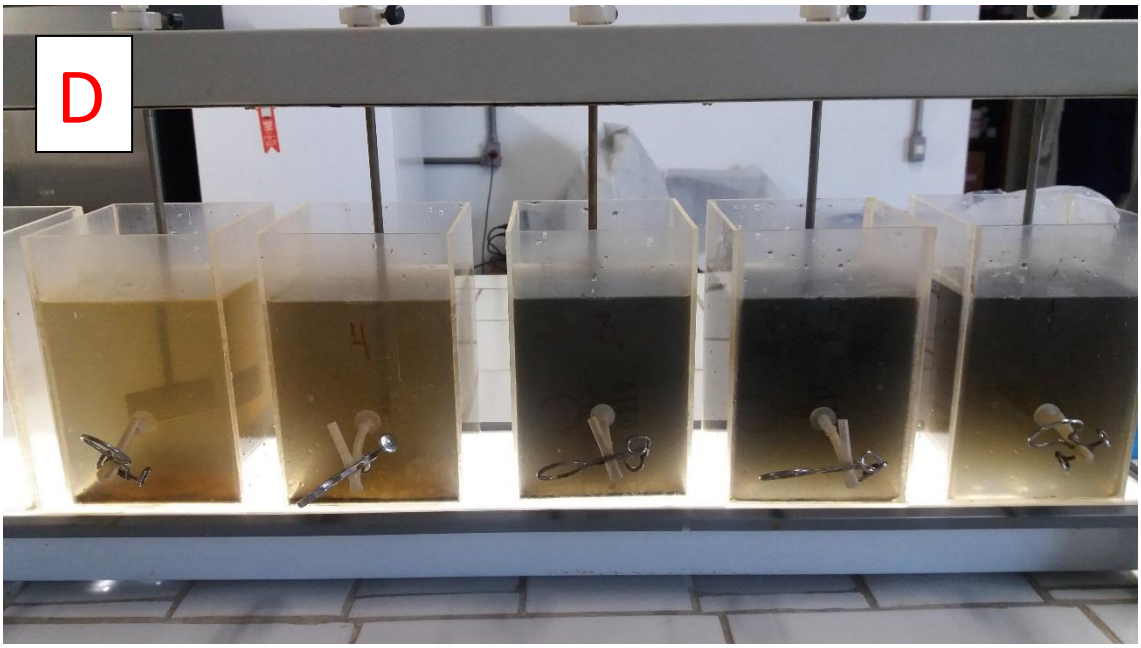
Amostras de água residuária tratadas com $FeCl_3$, $FeCl_2$, $FeSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$ apresentaram colorações distintas. A ausência de cor somente ocorreu para $FeCl_3$ (Figura 28).

Figura 28 – Ensaio em *Jar Test* com diferentes coagulantes $FeCl_3$, $FeCl_2$, $FeSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$. Fe após 10 minutos de decantação. Da direita para a esquerda as concentrações utilizadas foram 1, 10, 20, 40 e 60 mg/L de Fe. A - $FeCl_3$; B - $FeCl_2$; C - $FeSO_4$; D - $Fe_2(SO_4)_3$.




B
4
3
2
1


C
1

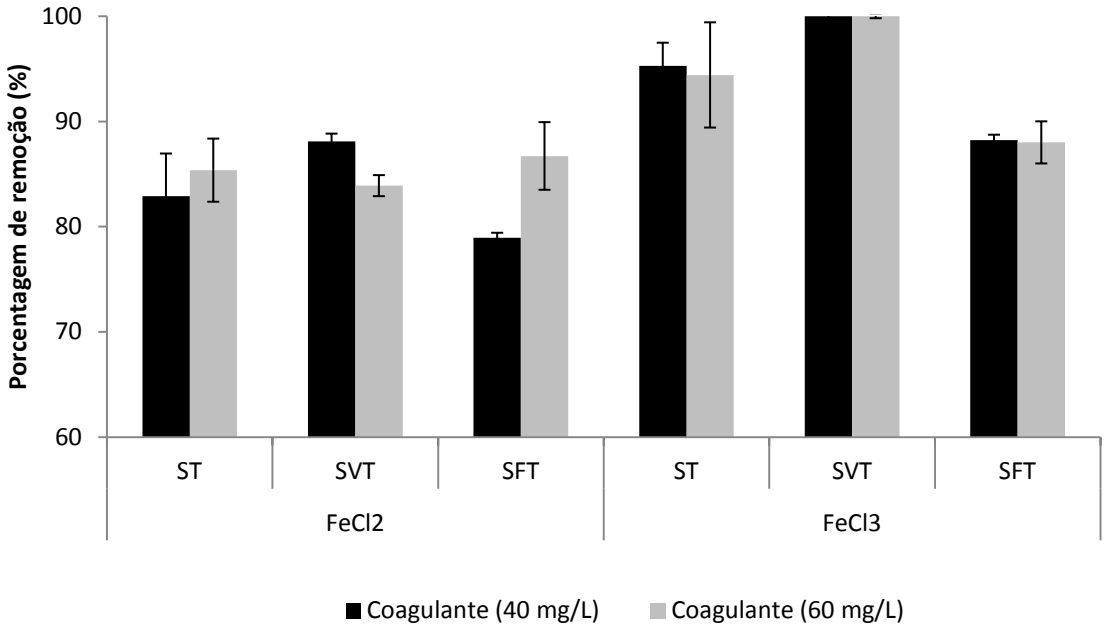


Fonte: ORTIZ, 2018.

Para avaliar outras características da água residuária após o tratamento foram selecionados apenas os coagulantes $FeCl_3$ e $FeCl_2$ por apresentaram a maior remoção da turbidez e as menores colorações. As concentrações selecionadas foram 40 e 60 mg/L de Fe, que também seguiram o mesmo critério de escolha. Em seguida foi avaliada a remoção de sólidos com os coagulantes nas concentrações selecionadas.

A remoção de sólidos totais, voláteis e fixos foi menor com $FeCl_2$ quando comparado com o coagulante $FeCl_3$. Não houve diferença estatística na remoção de sólidos entre as duas concentrações de 40 e 60 mg/L avaliadas para o coagulante $FeCl_3$ (Figura 29).

Figura 29 – Porcentagem de remoção de Sólidos Totais (ST), Sólidos Fixos Totais (SFT) e Sólidos Voláteis Totais (SVT) de água residuária tratada com $FeCl_2$ e $FeCl_3$ nas seguintes concentrações 40 e 60 mg/L de Fe. Ensaio realizado em triplicata.



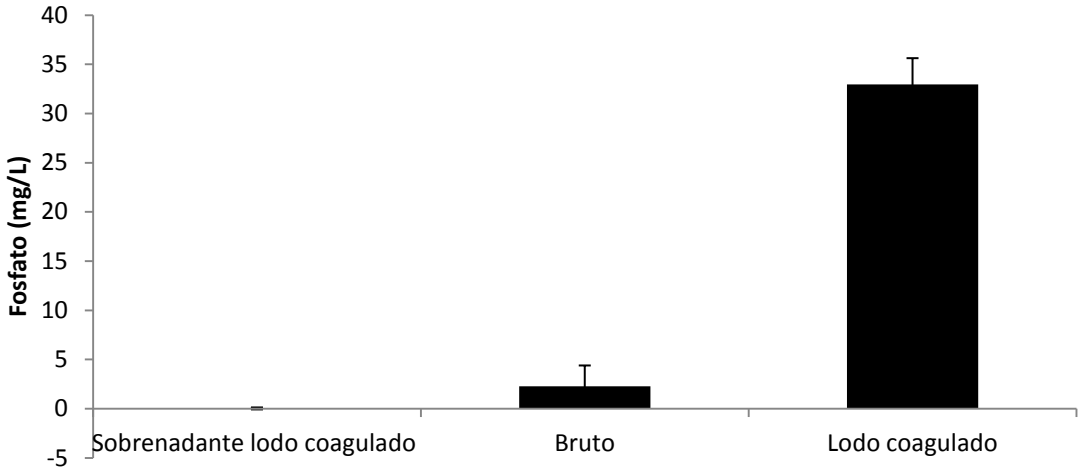
Fonte: ORTIZ, 2018.

Apesar das concentrações de 40 mg/L e 60 mg/L de $FeCl_3$ apresentarem as mesmas porcentagens de remoção de sólidos, adotou-se na sequência do trabalho a concentração maior (60 mg/L) devido à maior redução de turbidez obtida nesta concentração (99%).

Não foi preciso adicionar nenhum alcalinizante nos ensaios de coagulação, pois a adição de $FeCl_3$ à amostra de água residuária alterou o pH de 7,4 para 6,1, mantendo-o dentro da faixa de pH entre 4 e 6,5, considerada ideal para coagulação química (STEPHENSON e DUFF, 1996).

Realizando o balanço de massa constatou-se que a somatória do fosfato presente no lodo coagulado correspondia à quantidade contida na amostra de água residuária bruta solubilizada. Foram removidos 98% do fosfato presente no efluente com 60 mg/L $FeCl_3$ (Figura 30).

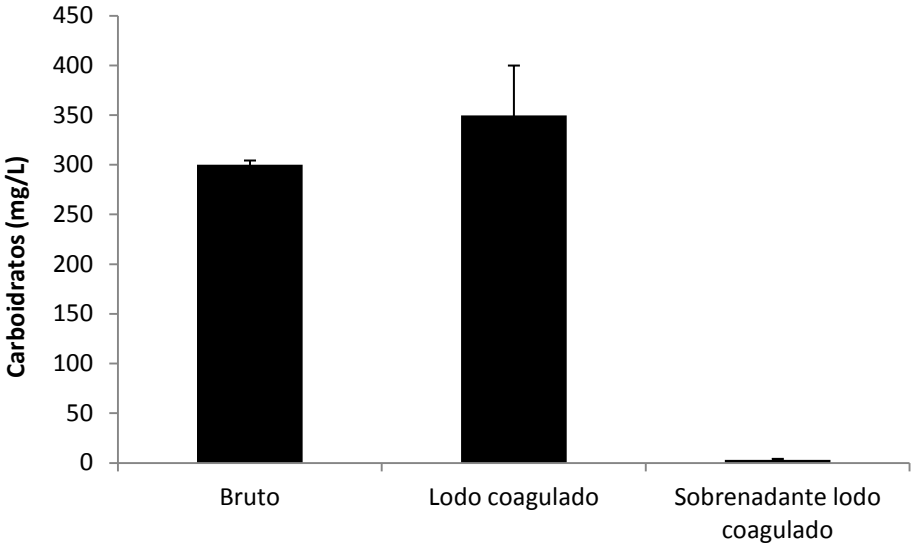
Figura 30 – Remoção do fosfato presente em 2 litros de amostra de água residuária com 60 mg/L $FeCl_3$. Ensaio realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A redução na concentração de carboidratos da fração líquida de água residuária foi de 85%, utilizando 60 mg/L de $FeCl_3$ (Figura 31).

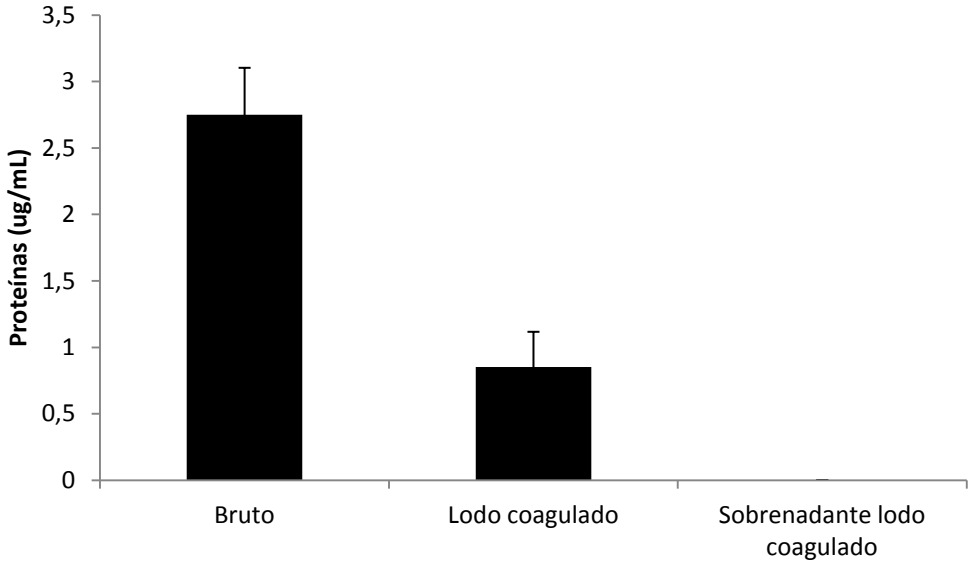
Figura 31 – Carboidratos na água residuária bruta, no lodo coagulado e no sobrenadante do lodo coagulado após coagulação com 60mg/L $FeCl_3$. Ensaio realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A remoção de proteínas presente na amostra também foi expressiva com 60 mg/L $FeCl_3$ (Figura 32).

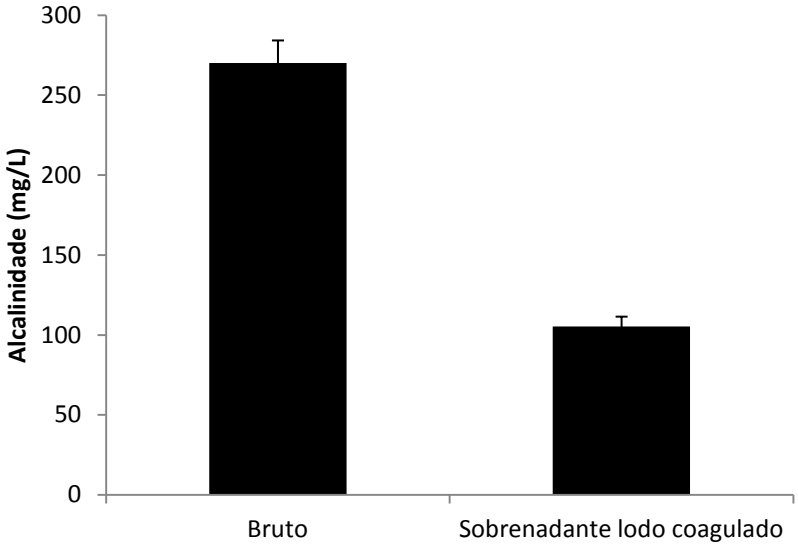
Figura 32 – Proteínas no efluente bruto, lodo coagulado com $FeCl_3$ (60 mg/L) e sobrenadante do lodo coagulado.Ensaio realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A coagulação reduziu significativamente a alcalinidade da amostra (Figura 33).

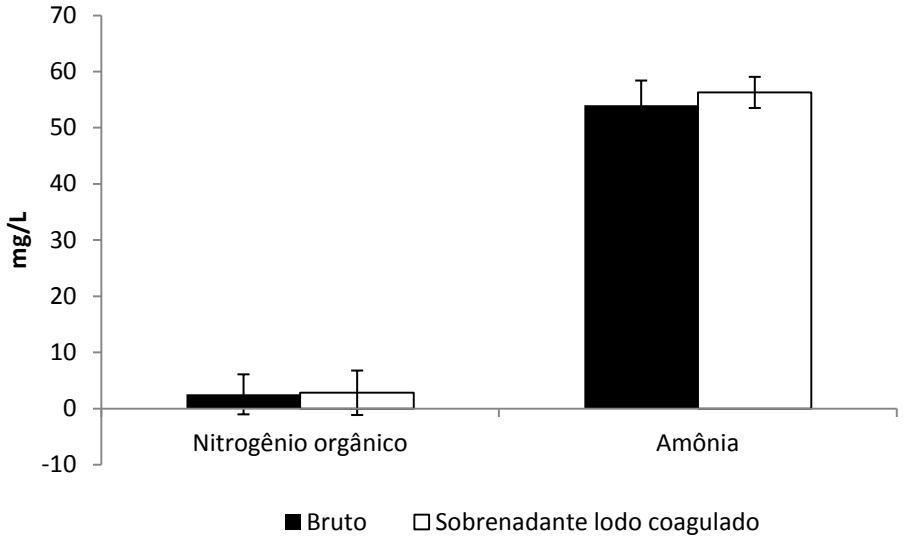
Figura 33 – Alcalinidade do efluente bruto e do sobrenadante do lodo coagulado.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Nitrogênio orgânico e amônia foram os únicos parâmetros analisados que permaneceram praticamente inalterados no sobrenadante após a coagulação com 60 mg/L de $FeCl_3$ (Figura 34).

Figura 34 – Nitrogênio orgânico e amônia em água residuária antes e após a coagulação.



Fonte: ORTIZ, 2018.

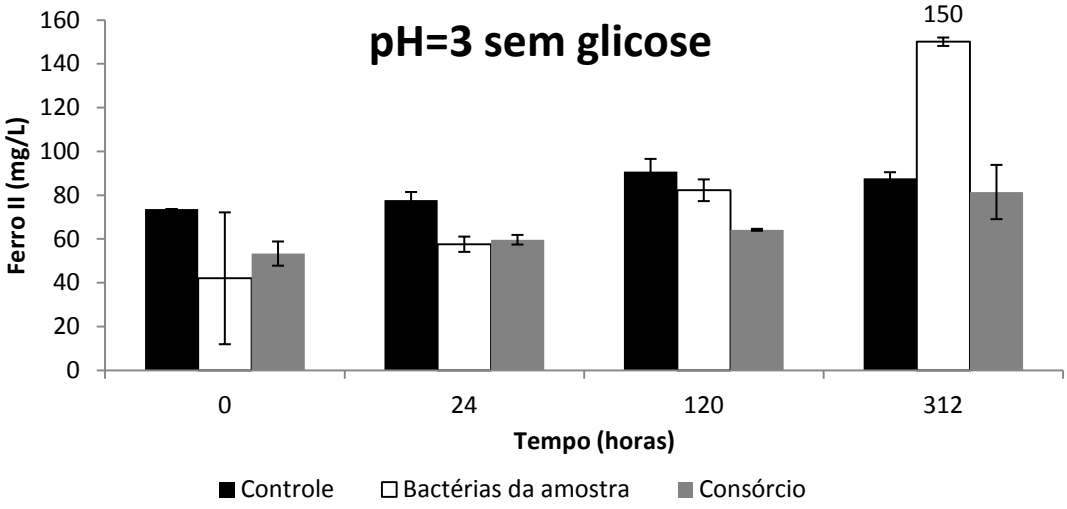
Os resultados obtidos na coagulação de água residuária do CRUSP com 60 mg/L de $FeCl_3$ demonstram a eficácia deste coagulante para remoção de sólidos totais, fosfato, carboidratos e alcalinidade da água residuária.

Em seguida foi avaliada a capacidade das bactérias redutoras de ferro em recuperar (remobilizar) o ferro utilizado como coagulante do lodo coagulado. O grupo consórcio foi obtido em ensaios utilizando minério de ferro como aceptor final de elétrons, o outro grupo são microrganismos presentes na própria água residuária proveniente do CRUSP.

4.3.2 Remobilização do ferro coagulado

No ensaio com pH =3 os valores de ferro em solução não apresentaram diferenças estatísticas nas primeiras 120 horas de incubação entre o controle, o consórcio e as bactérias da amostra de água residuária (Figura 35), mas após 312 horas ocorreu um aumento da concentração de ferro para a amostra contendo bactérias da água residuária. O grupo consórcio possuía três bactérias (*Bacillus circulans*, *Clostridium beijerinckii* e *Klebsiella oxytoca*), isoladas e identificadas como redutoras de ferro. A recuperação de ferro obtida por bactérias presentes na água residuária foi de 63 mg/L, após 312 horas.

Figura 35 – Produção de ferro sem adição de fontes de carbono em pH = 3. Foram avaliadas as bactérias presentes da própria amostra, do consórcio e do controle.

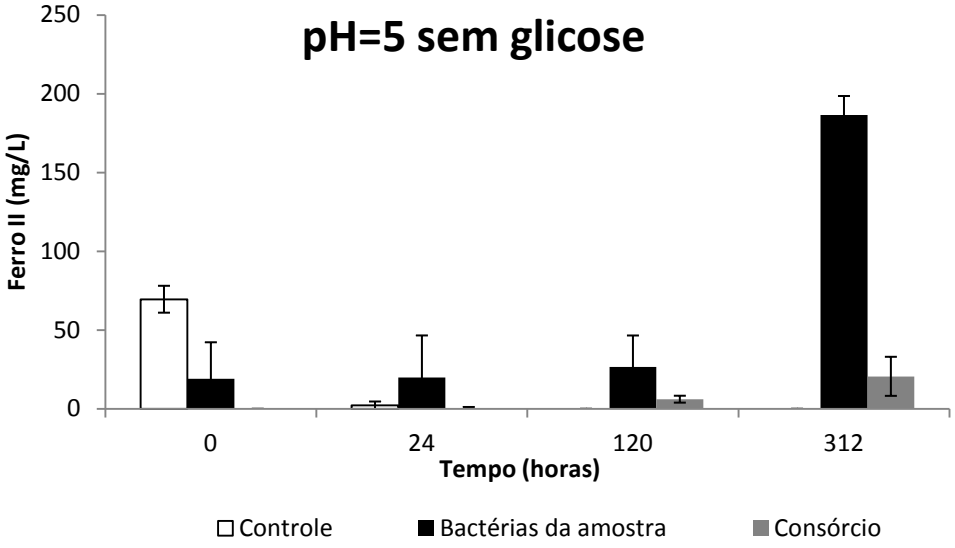


Fonte: ORTIZ, 2018.

No ensaio de remobilização do ferro coagulado em pH= 5, o grupo contendo as bactérias da própria amostra foi mais eficiente, permitindo a recuperação de 29% do ferro do coagulante incorporado no depósito, sem adição de doadores de elétrons externos. Este percentual de 29% na recuperação do ferro coagulado foi semelhante ao obtido nas amostras com pH = 3, porém com a adição de um volume bem menor de ácido para ajustar o pH.

Para o grupo controle, houve uma elevada concentração de ferro no tempo inicial (tempo zero). Isto porque, durante a esterilização, o líquido sofreu fervura causando a agitação do meio líquido, o que levou à ressuspensão do ferro decantado, e consequentemente um maior teor de ferro em suspensão. Após 24 horas, o teor de ferro baixou para valores não detectáveis (abaixo de 1 mg/L) no grupo controle (Figura 36).

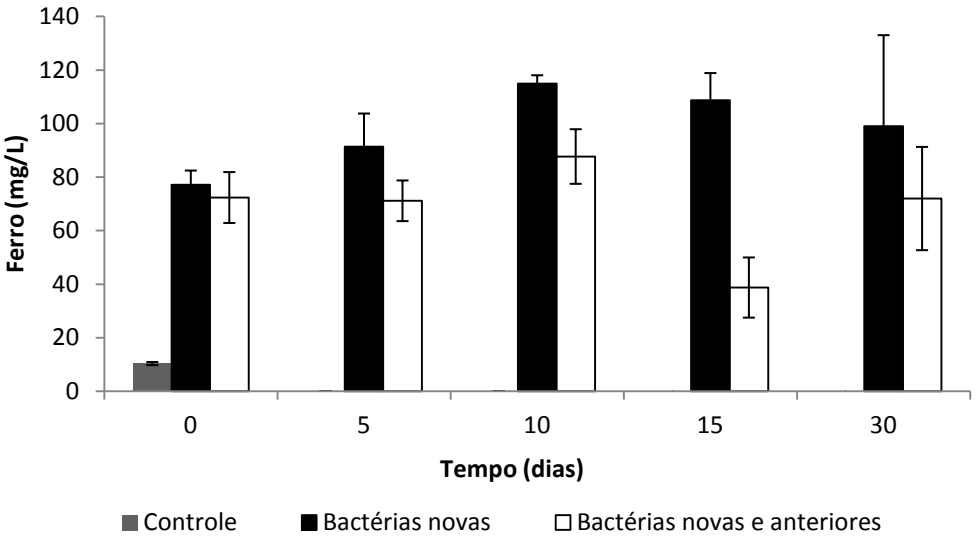
Figura 36 – Remobilização do Fe em pH= 5, sem adição de fontes de carbono.Foram utilizadas como inóculos as bactérias da própria amostra e do consórcio. Para o grupo controle foram esterilizadas as amostras. Ensaios realizados em triplicatas.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Para verificar se as bactérias redutoras de ferro presentes na água residuária seriam capazes de remobilizar novamente o ferro coagulado, elas foram reinoculadas em uma nova amostra de água residuária coagulada e não estéril. Paralelamente, outro ensaio avaliou a atuação das bactérias presentes na água residuária recém coletada, neste ensaio estas bactérias “frescas” foram chamadas de bactérias novas. A média de recuperação para as bactérias novas foi de 20%, enquanto que, para o conjunto das bactérias novas com as anteriores, a média foi de 14% (Figura 37). Houve diferença estatística apenas nos tempos de 10 e 15 dias entre as bactérias novas e o conjunto das bactérias novas com as anteriores, mas após 30 dias a recuperação de ferro apresentou valores iguais estatisticamente para ambas as amostras.

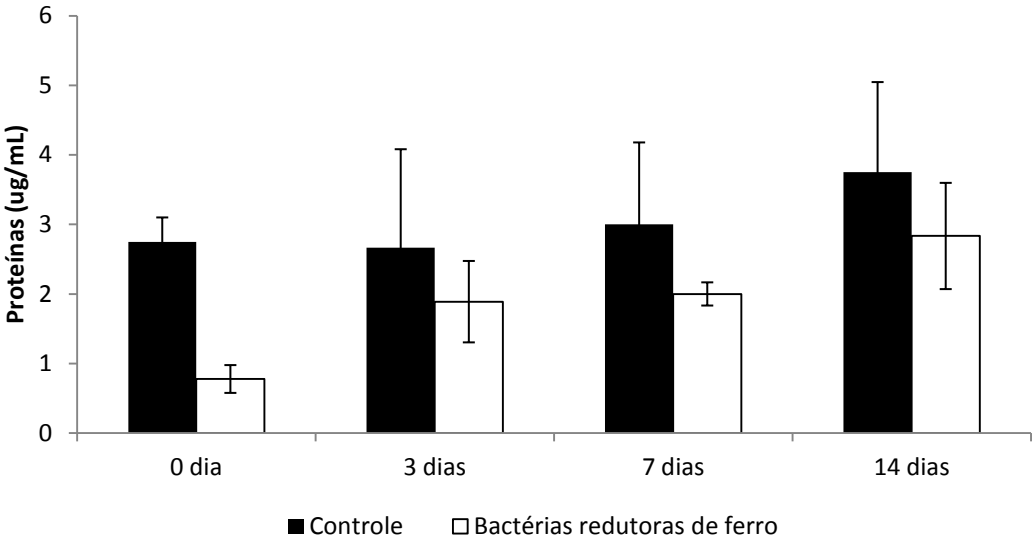
Figura 37 – Análise do ferro total nas amostras: controle (esterilizado), bactérias presentes na própria amostra de água residuária e bactérias presentes no ensaio anterior (2 mL) junto com as bactérias presente da água residuária. Sem adições de doadores de elétrons externo.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A concentração de proteínas durante a recuperação do ferro permaneceu praticamente inalterada durante os 14 dias de ensaio, as diferenças das médias não foram estatisticamente relevantes (Figura 38).

Figura 38 – Análise de proteínas durante a recuperação do ferro no grupo controle e no grupo contendo bactérias redutoras de ferro. Realizado em triplicata.

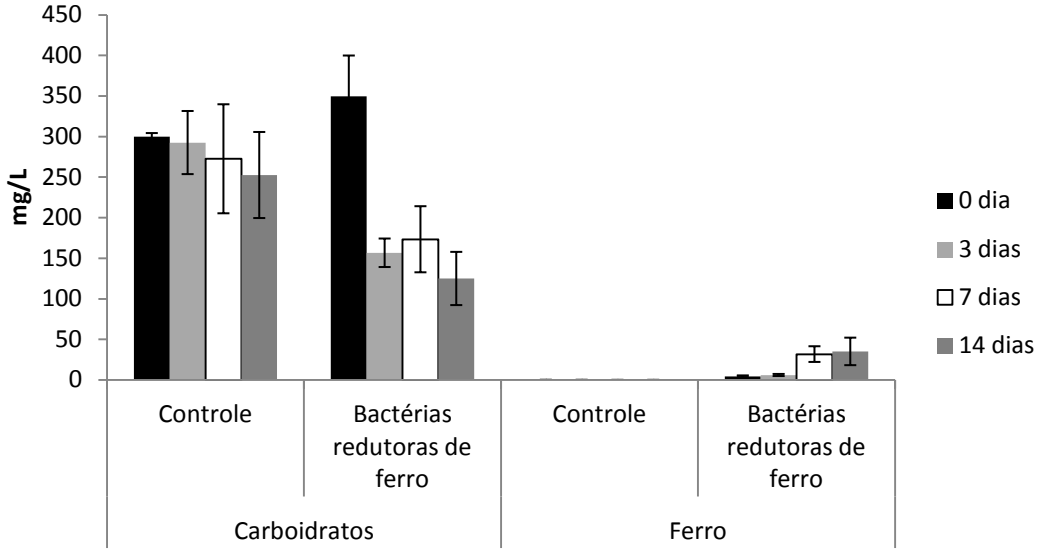


Fonte: ORTIZ, 2018.

Durante a remobilização de ferro da fração coagulada, as bactérias redutoras de ferro presentes na amostra metabolizaram compostos orgânicos utilizados como

doadores de elétrons. O teor de carboidratos da fração coagulada foi reduzido de 350 mg/L para 150 mg/L durante os primeiros 3 dias de cultivo e permaneceu constante durante os próximos 11 dias (Figura 39). Houve a recuperação de 29% do ferro no grupo contendo bactérias redutoras de ferro.O valor de pH nestes ensaios foi 6.

Figura 39 – Consumo de carboidratos e produção de ferro no decorrer do experimento do reciclo em amostras controle e amostras contendo bactérias redutoras de ferro. Ensaios realizados em triplicata.



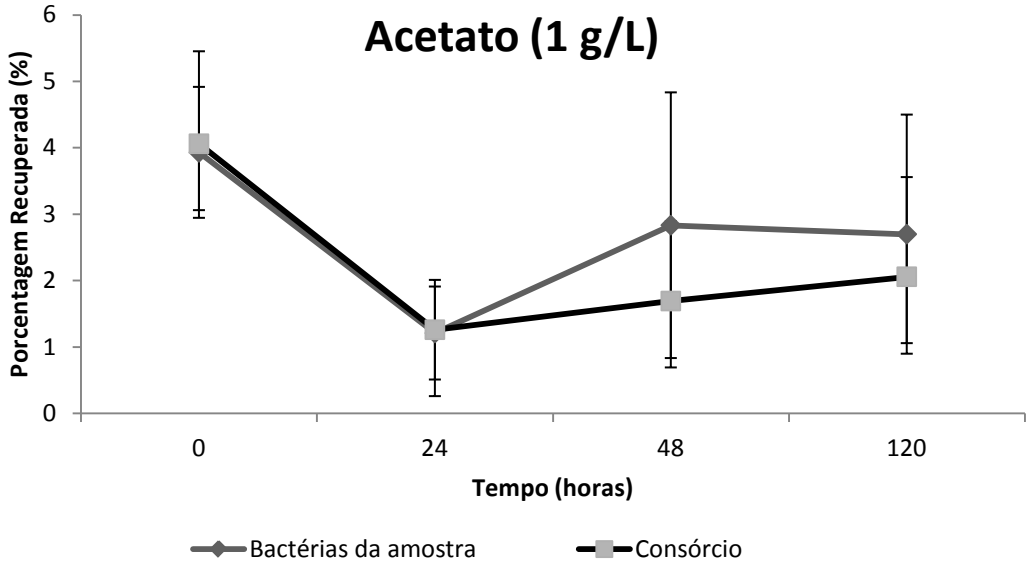
Fonte: ORTIZ, 2018.

Como a remobilização do ferro não ultrapassou 29% nos últimos ensaios realizados, avaliando-se somente os carboidratos da própria água residuária em diferentes valores de pH, optou-se por realizar um novo ensaio com adição de diferentes fontes de carbono.

Inicialmente foram testados o acetato e a glicose como fontes de carbono na concentração de 1 g/L em pH=5.

A porcentagem de recuperação de ferro na forma de Fe (II) foi muito baixa utilizando acetato como fonte de carbono, tanto para as bactérias da própria amostra de água residuária quanto para o consórcio, não passando de 4% (Figura 40). Não houve diferença estatística para as bactérias da própria amostra de água residuária e do consórcio na recuperação do ferro.

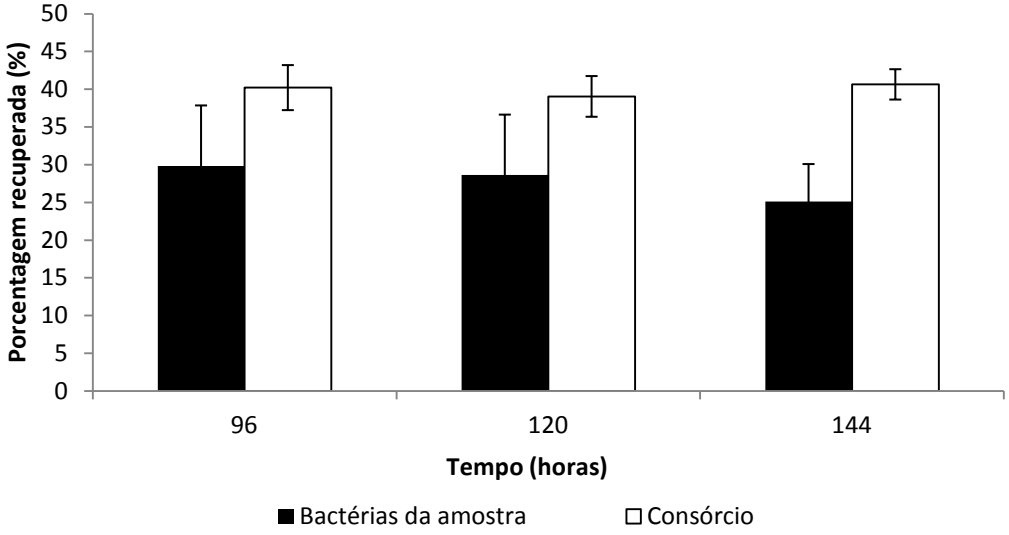
Figura 40 – Porcentagem de recuperação do ferro na presença de acetato como fonte de carbono (1 g/L), utilizando bactérias da própria amostra e bactérias do consórcio. Realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Utilizando glicose como doador de elétrons (1 g/L), a porcentagem de recuperação foi de 40% para bactérias do consórcio e 30% para as bactérias da própria amostra, permanecendo constante após 96 horas de ensaio no pH = 5 (Figura 41).

Figura 41 – Recuperação do ferro utilizando glicose como fonte de carbono (1 g/L). Utilizaram-se como inóculo as bactérias presentes da própria amostra de água residuária e bactérias do consórcio.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A remobilização de Fe (II) pelo processo biológico descrito neste trabalho não resultou em transferência de metais pesados do material coagulado para a fração líquida (Tabela 3).

Tabela 1. Análise elementar por Espectrometria de Emissão Óptica (ICP) na fração líquida após recuperação do ferro coagulado.

Elementos	Concentração (mg/L)
Ag	-0,016*
Al	-0,335*
Au	0,092*
Ca	17,9
Cd	0,041*
Co	-0,072*
Cr	1,07
Cu	-0,12*
In	0,104*
Mg	3,33
Mn	-0,561*
Na	55,1
Ni	-0,332*
Pb	0,045*
Sn	0,098*
Zn	-0,291*

*Concentrações que estavam abaixo da curva de concentração de 1 mg/L.

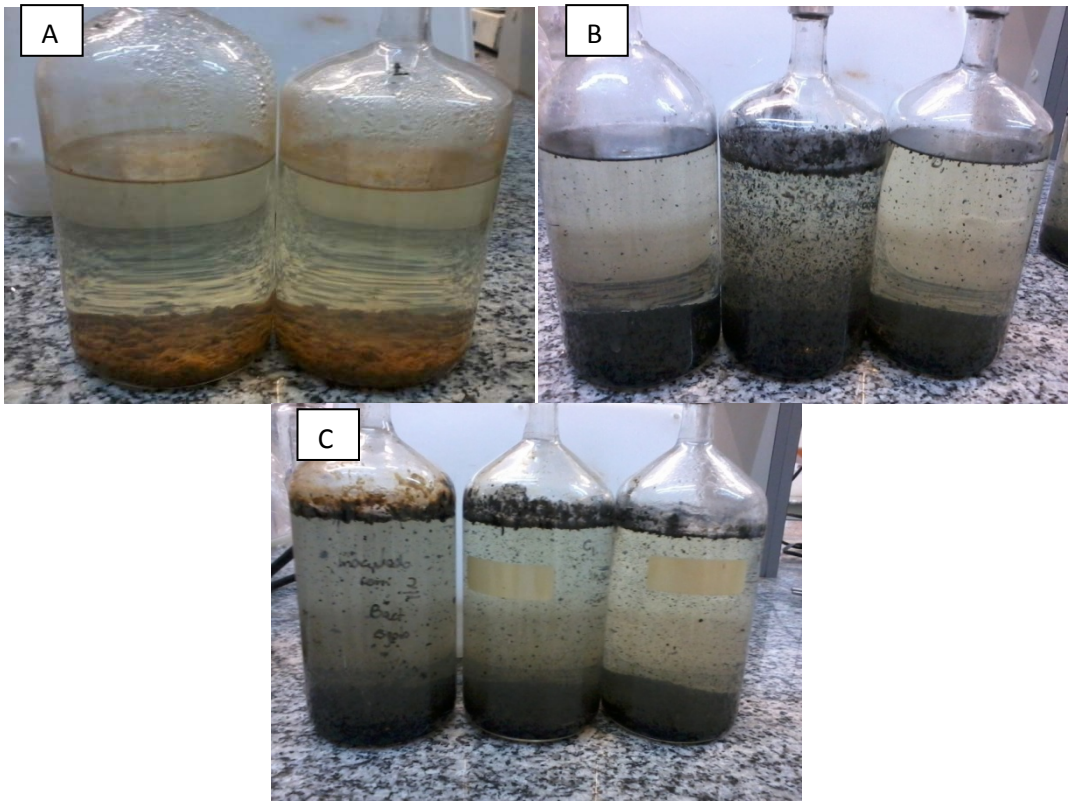
Fotografias de ensaios com amostras estéreis demonstram que permaneceram inalteradas durante o período do ensaio, conforme esperado (Figura 42 – A).

Nos frascos contendo as bactérias da própria amostra ocorreram diferenças entre as réplicas (Figura 42 – B). Na amostra B ocorreu a ressuspensão de uma quantidade maior de agregados formados na coagulação. Durante os ensaios foi observada a produção de bolhas de gases no interior do depósito de matéria orgânica coagulada. As partículas suspensas foram arrastadas, pelas bolhas, para a parte superior dos frascos.

A produção de bolhas de gás foi ainda maior nos ensaios onde o material coagulado do esgoto foi misturado com as bactérias do ensaio anterior na remobilização

do ferro (Figura 43– C), ocorrendo acúmulo de sólidos na interface líquido/gás nos três frascos.

Figura 42 – Comportamento da fração líquida e sólida, após 30 dias de incubação à 37ºC, sem agitação e com volume para cada frasco de 500 mL. A - Amostras estéreis; B – Bactérias da própria amostra; C – Bactérias da própria amostra com bactérias isoladas do ensaio anterior da remobilização do Fe.



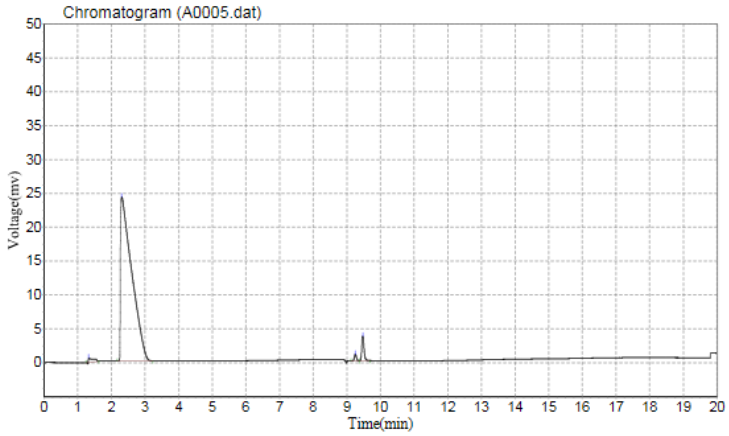
Fonte: ORTIZ, 2018.

As bolhas produzidas no interior dos frascos de microcosmos são gases formados pelo metabolismo anaeróbio dos microrganismos da água residuária incorporados no depósito da coagulação. Para verificar a composição qualitativa deste biogás, as amostras foram analisadas no equipamento de cromatografia gasosa (GC). Foram realizadas leituras em TCD dos gases dióxido de carbono, metano e da fração gasosa da amostra de recuperação do coagulante. A comparação dos tempos de retenção indica que o gás produzido nos ensaios continha metano e CO_2 (Figura 43, 44, 45 e 46).

Foram realizadas duas leituras para cada tipo de gás (metano e dióxido de carbono) e em seguida ambos os gases foram misturados e analisados.

Abaixo se encontra o cromatograma obtido para o gás dióxido de carbono (CO_2), cujo tempo de retenção que foi de 2,3 minutos (Figura 43).

Figura 43 – Cromatograma do gás dióxido de carbono (CO_2).



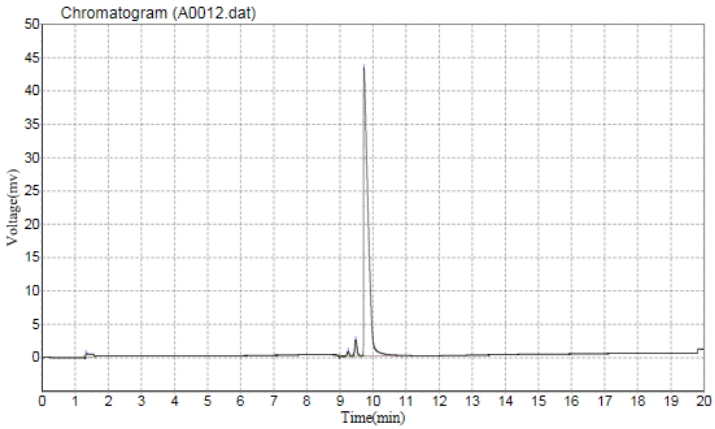
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1.328	636.793	7071.260	1.2006
2		2.308	24168.727	560446.875	95.1549
3		9.252	994.277	4350.616	0.7387
4		9.470	3610.737	17115.043	2.9059
Total			29410.534	588983.794	100.0000

Fonte: ORTIZ, 2018.

Em seguida, foram realizadas duas leituras para o gás metano (CH_4, Figura 44). O tempo de retenção foi de 9,7 minutos, obtido nas duas réplicas.

Figura 44 – Cromatograma do gás metano (CH_4).



Results

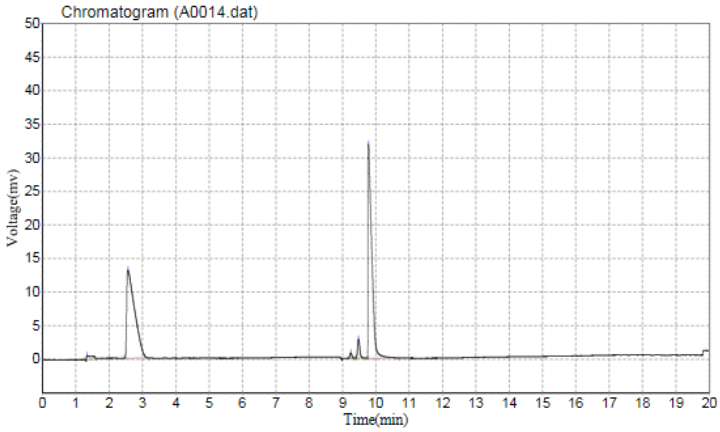
Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1.328	554.741	7161.478	1.7424
2		9.248	695.892	3532.604	0.8595
3		9.477	2463.781	11979.484	2.9147
4		9.725	43178.125	388327.188	94.4833
Total			46892.540	411000.753	100.0000

Fonte: ORTIZ, 2018.

Fez-se necessário realizar duas novas leituras dos dois gases (CO_2 e CH_4) para verificar se o tempo de retenção sofreria variação quando estes gases fossem analisados juntos. O gás dióxido de carbono apresentou uma pequena variação no tempo de retenção, de 2,3 para 2,5 minutos (Figura 45), resultado considerado confiável para ser utilizado nas comparações com os picos obtidos na amostra.

No caso do gás metano, as variações no tempo de retenção foram pequenas na comparação com as análises feitas sem a mistura. O valor anterior havia sido de 9,7 minutos, e os novos resultados com a mistura foram de 9,7 e 9,8 minutos, do que se conclui que ambos os gases foram considerados confiáveis para serem utilizados nas comparações com os picos obtidos pela amostra, conforme se observa abaixo.

Figura 45 – Cromatograma dos gases: metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2).



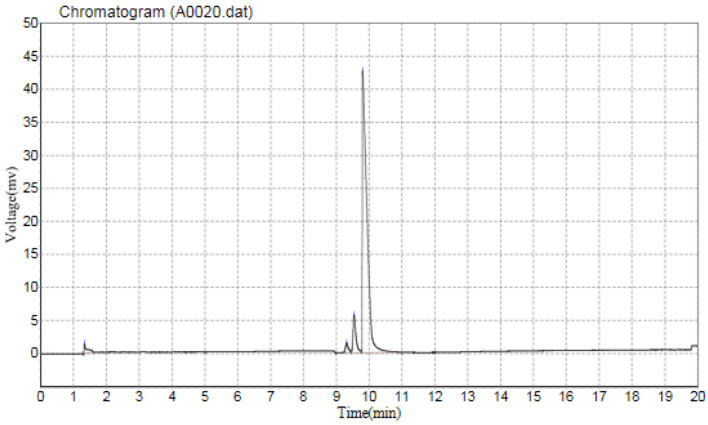
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1.332	587.895	7540.167	1.5686
2		2.565	13115.045	218060.750	45.3636
3		9.250	776.023	3385.050	0.7042
4		9.478	2827.514	13280.250	2.7627
5		9.777	31843.125	238429.047	49.6009
Total			49149.602	480695.263	100.0000

Fonte: ORTIZ, 2018.

Por meio de comparações do tempo de retenção, foi possível confirmar que as bactérias redutoras de ferro presentes nos ensaios de remobilização produziram apenas metano (Figura 46).

Figura 46 – Cromatograma do gás da amostra contendo as bactérias redutoras de Fe.



Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1.337	1502.274	9029.512	1.9529
2		9.310	1508.684	8690.606	1.8796
3		9.538	5735.071	35292.090	7.6330
4		9.798	42630.117	409348.781	88.5345
Total			51376.146	462360.989	100.0000

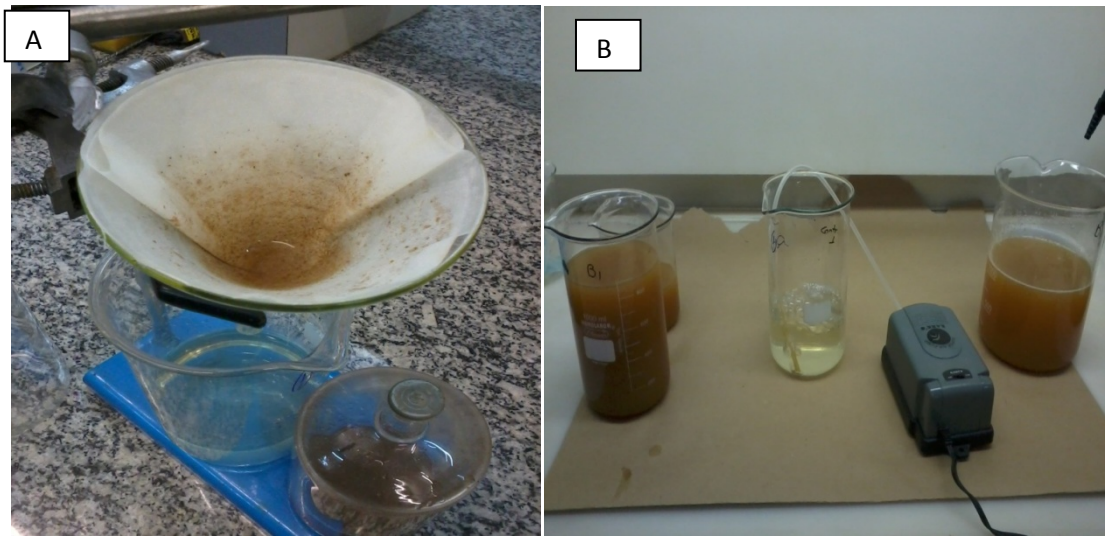
Fonte: ORTIZ, 2018.

4.3.3 Oxidação do ferro

A formação de bolhas de gases, na amostras que continham o ferro recuperado (descrito anteriormente e observado na Figura 46), causou um arraste de frações sólidas para o sobrenadante. Desta forma, decidiu-se por filtrar a fração líquida para separar as partículas de ferro dos compostos orgânicos coagulados. Todas as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de 3 micras.

Após a filtração, as amostras foram aeradas por uma hora, para que houvesse a oxidação do Fe (II) para Fe (III). O principal motivo para a oxidação deve-se a espécie de Fe (III) que apresentou melhores resultados na escolha do coagulante. Durante este processo, a amostra praticamente translúcida (Figura 47 – A) produzida no processo de recuperação de ferro assumiu uma coloração amarelo-escuro devido à formação de fases de óxidos de ferro (Figura 47 – B).

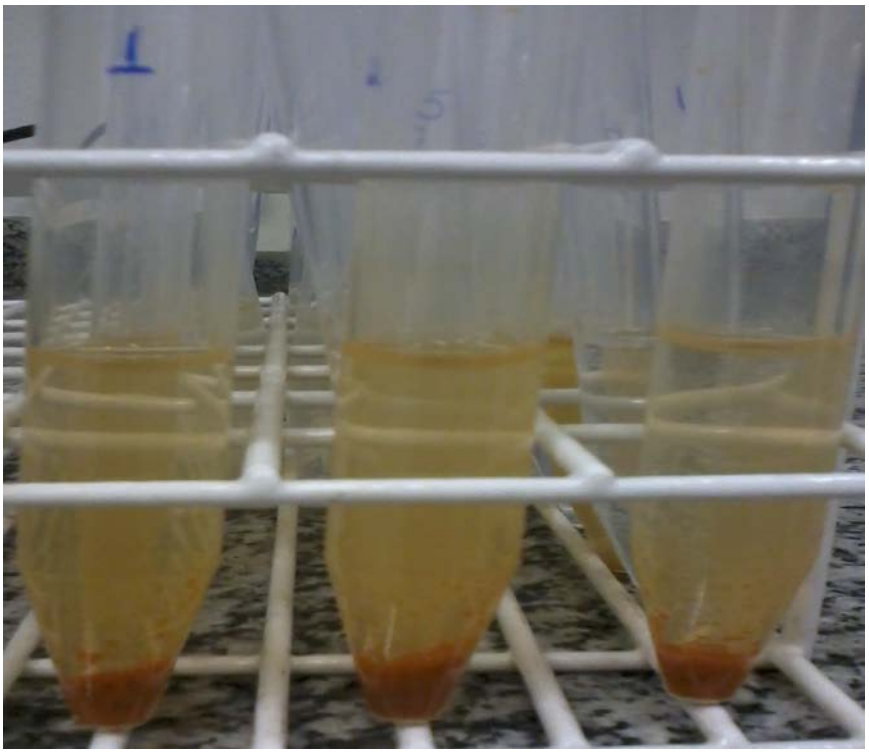
Figura 47 – Filtração e oxidação das amostras. A - Filtração das amostras antes da oxidação; B – Comparações de cores nas diferentes amostras.



Fonte: ORTIZ, 2018.
Legenda: As colorações laranja escuro e com turbidez elevada são de amostras já oxidadas e a amostra central iniciou a oxidação. Foi possível visualizar a olho nu as diferenças de cores nas amostras antes e depois da oxidação. Na amostra do centro o borbulhamento com ar estava na fase inicial no exato momento da captura da imagem, já as amostras nas laterais, com coloração laranja escuro, já haviam sido oxidadas com o aerador.

Os óxidos de Fe (III) produzidos na aeração do sobrenadante contendo o ferro recuperado precipitaram após 30 minutos por sedimentação natural (Figura 48).

Figura 48 – Formação de óxidos de Fe (III) após a aeração das amostras e com 30 minutos de sedimentação natural.



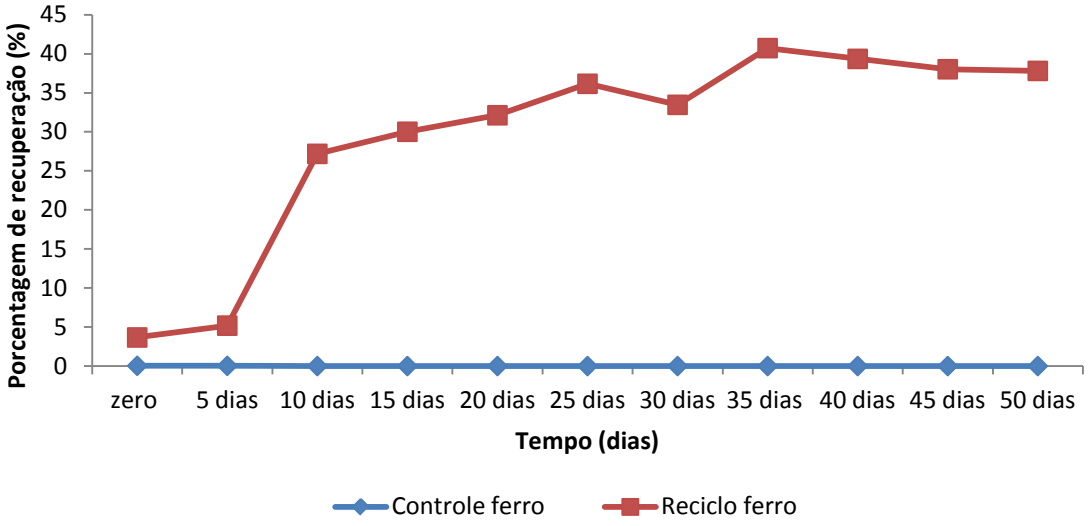
Fonte: ORTIZ, 2018.

Os depósitos de sedimentação de ferro oxidado (Figura 48) foram secados por 3 dias em estufa à 100ºC. Após este tempo, o depósito contendo Fe (III) foi pesado em balança analítica. Foram obtidos 0,721g em ensaios com bactérias do esgoto e 0,6761g para amostras inoculadas com organismos de ensaio anterior, ambos resultados do peso total das amostras. A massa de óxido obtida foi testada como coagulante e os resultados encontram-se no tópico Aplicação do ferro recuperado, mais adiante.

4.3.4 Análise do comportamento microbiano

A percentagem máxima de recuperação do ferro foi de 40%, após 35 dias de ensaio (Figura 49). Quase metade do coagulante utilizado pôde ser recuperado sem utilizar fontes externas de carbono.

Figura 49 – Porcentagem de recuperação do coagulante ($FeCl_3$ – 117 mg) nos grupos controle (estéril)e reciclo de ferro.



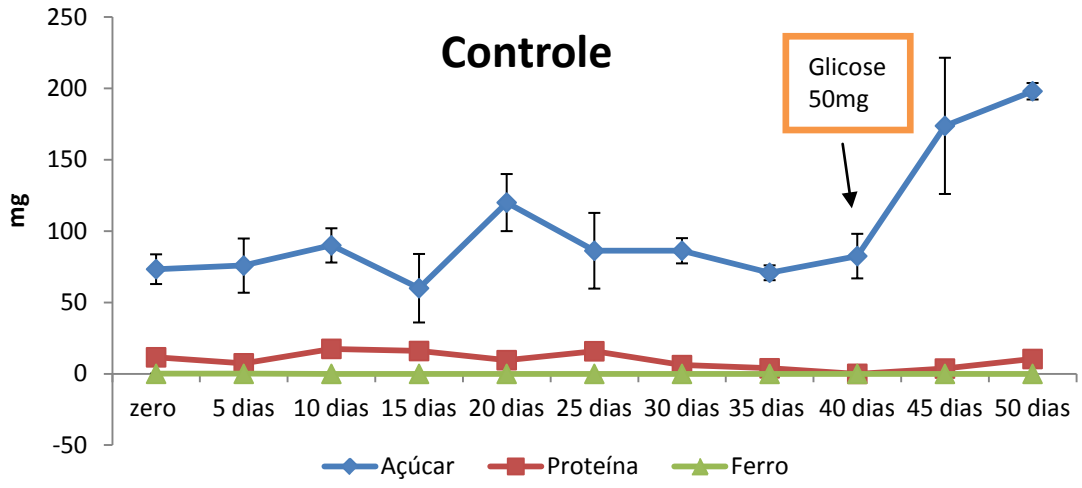
Fonte: ORTIZ, 2018.

Para confirmar que na presença de doadores de elétrons ocorre um aumento na concentração da recuperação do ferro coagulado, foram realizados novos ensaios avaliando o comportamento dos carboidratos, das proteínas e do ferro em diferentes amostras. As amostras analisadas foram: controle (água residuária esterilizada), reciclo ferro (água residuária contendo as bactérias da própria amostra) e bactérias novas e anteriores (bactérias presentes na própria amostra de água residuária e bactérias que estavam presentes nos ensaios anteriores de recuperação do Fe).

No decorrer de 39 dias de ensaio não foram adicionadas fontes de carbono, apenas no 40º dia foram adicionados 50 mg/L de glicose para as amostras controle e reciclo ferro, com a finalidade de verificar se haveria uma maior recuperação de ferro com uma nova fonte de carbono.

No grupo controle, não ocorreu solubilização de ferro (Figura 50) e as concentrações de açúcares e de proteínas também permaneceram estáveis. O aumento de açúcares a partir de 45 dias refletiu a adição de glicose.

Figura 50 – Amostra controle do ensaio de recuperação do coagulante ($FeCl_3$ – 117 mg). Após 40 dias foi adicionado 50 mg/L de glicose.

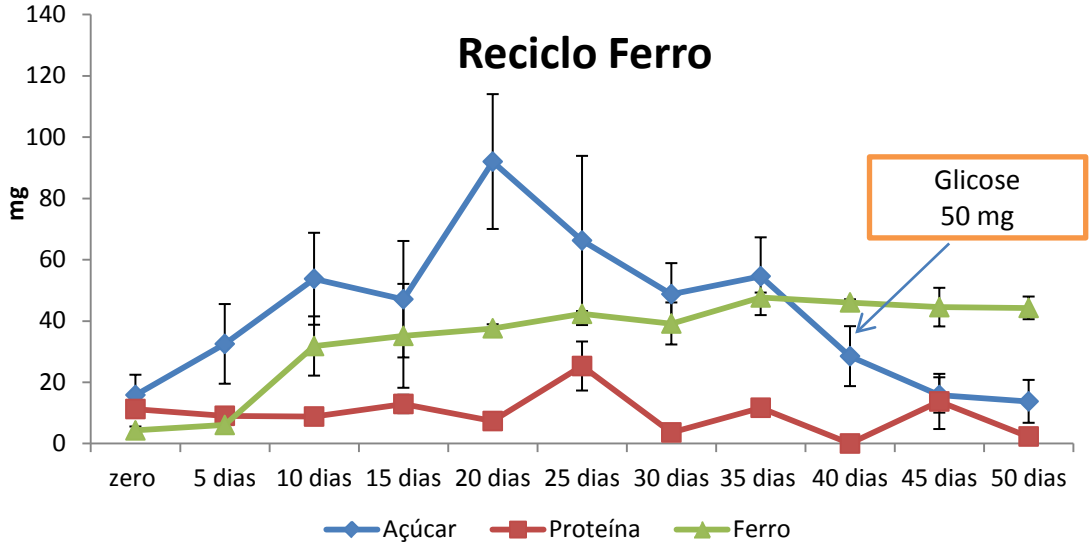


Fonte: ORTIZ, 2018.

Já no ensaio de reciclagem com bactérias da própria amostra, a recuperação máxima de 40% foi atingida após 35 dias, mas em 10 dias já havia uma elevada porcentagem de recuperação (27%). A adição de 50 mg de glicose após 40 dias não resultou em melhora na recuperação de ferro (Figura 51). O teor de açúcares na amostra aumentou nos primeiros 20 dias de cultivo e diminuiu gradualmente após este período.

A adição de 50 mg de glicose após o 40º dia não resultou no aumento da concentração deste açúcar na cultura, demonstrando a capacidade de metabolismo rápido.

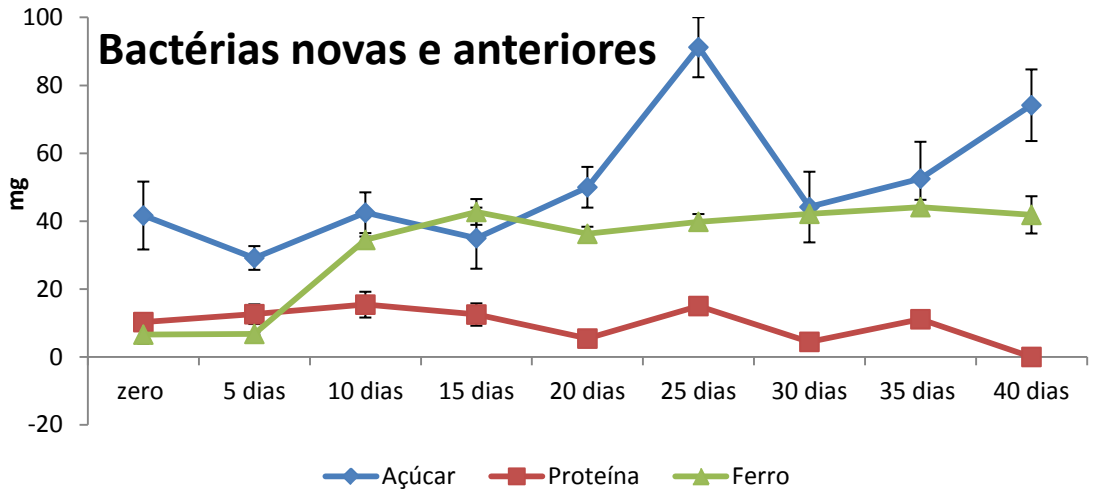
Figura 51 – Ensaio da recuperação do ferro com bactérias da própria amostra de água residuária. Adição de glicose (50 mg) após 40 dias de ensaio. Realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Para verificar a ocorrência de enriquecimento de bactérias redutoras de ferro e uma consequente melhora na recuperação do ferro, foi realizado um experimento onde a comunidade enriquecida (de um experimento de recuperação concluído) foi transferida para um ensaio preparado com material recém-coagulado. A eficiência de recuperação de ferro após este ensaio foi estatisticamente similar à de ensaios conduzidos sem cultura enriquecida, demonstrando que o processo de enriquecimento não resultou em aumento da população de bactérias redutoras de ferro que catalisam a remobilização de ferro (Figura 52).

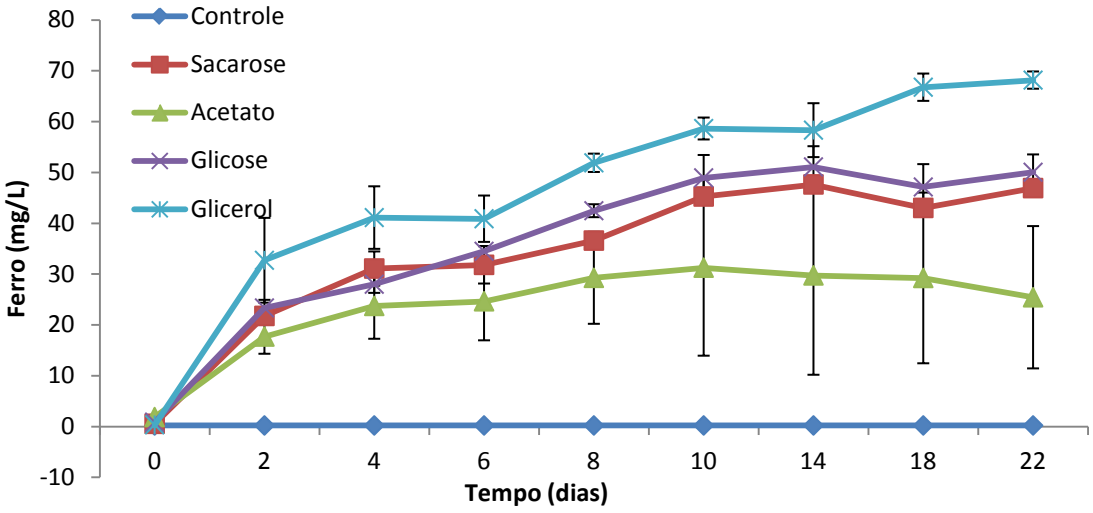
Figura 52 – Ensaio de regeneração do coagulante ($FeCl_3$ – 117 mg), utilizando bactérias novas e anteriores. Realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Para investigar a possibilidade de aumentar a eficácia na recuperação de ferro do material coagulado foram testados outros potenciais doadores de elétrons incluindo sacarose, acetato, glicose e glicerol, todas na mesma concentração de 0,277 mmol. O grupo controle (estéril) não apresentou recuperação de ferro, semelhante aos resultados obtidos nos ensaios anteriores. Entre as culturas que receberam reforço de doadores de elétrons a recuperação de ferro ocorreu nas culturas com glicerol (58%) seguido de glicose (42%), sacarose (42%) e acetato (26%, Figuras 53). Houve diferença estatística entre as fontes: sacarose, glicose e glicerol.

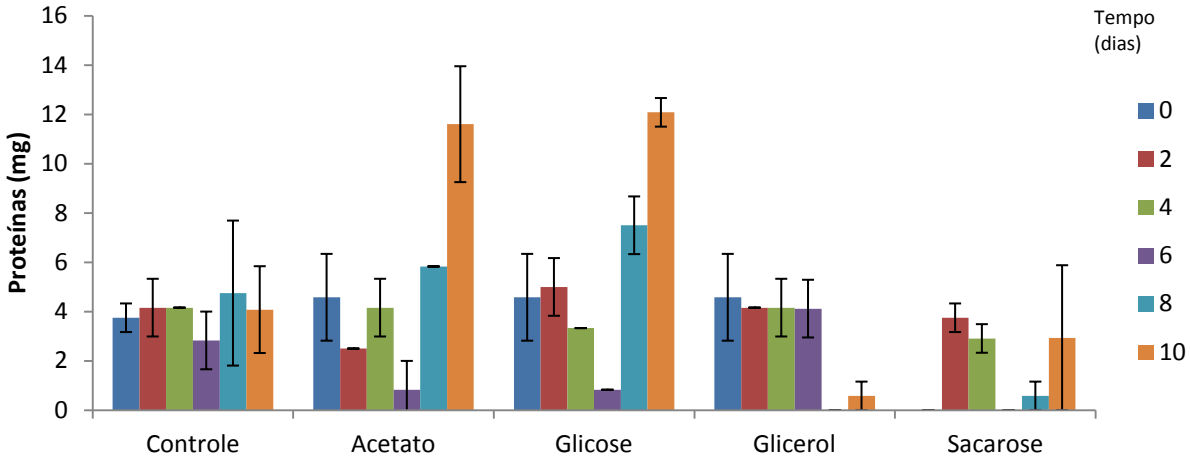
Figura 53 – Quantificação de ferro no ensaio de regeneração do coagulante utilizando diferentes fontes de carbono (nenhuma – controle, sacarose, acetato, glicose e glicerol) todos na concentração de 0,277 mmol.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A concentração de proteínas nas amostras aumentou somente nos ensaios conduzidos com acetato e glicose (Figura 54), possivelmente devido ao aumento da população microbiana nestas amostras.

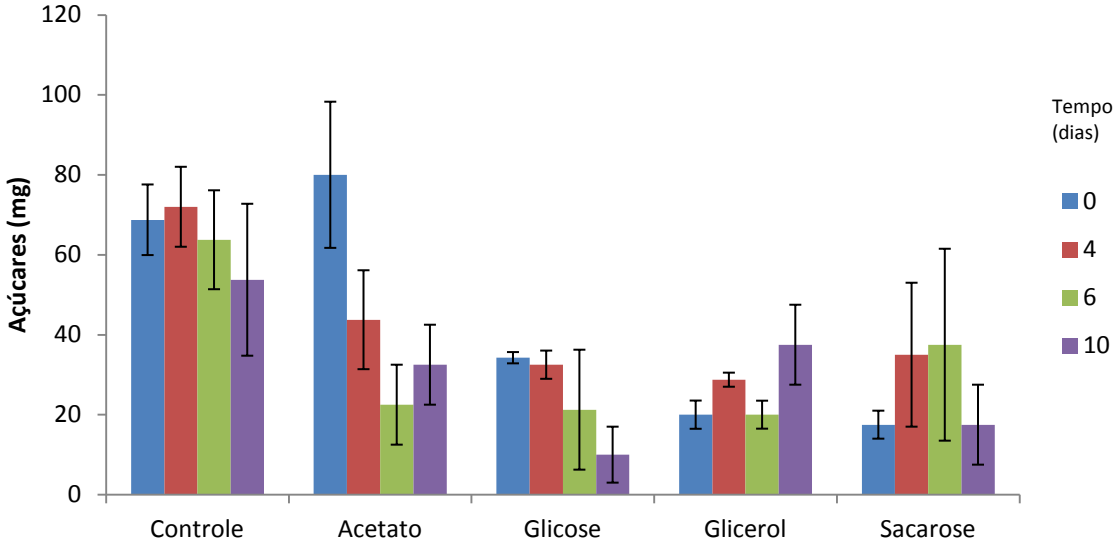
Figura 54 – Proteínas no ensaio de regeneração do coagulante utilizando diferentes fontes de carbono (controle, sacarose, acetato, glicose e glicerol) todos na concentração de 0,277 mmol. Realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

A concentração de carboidratos nas amostras diminuiunos ensaios com adição de acetato e de glicose, mas não houve alteração significativa nos ensaios conduzidos com glicerol e sacarose (Figura 55). Apesar da diferença visível na quantidade de açúcares não houve diferença estatística entre as amostras.

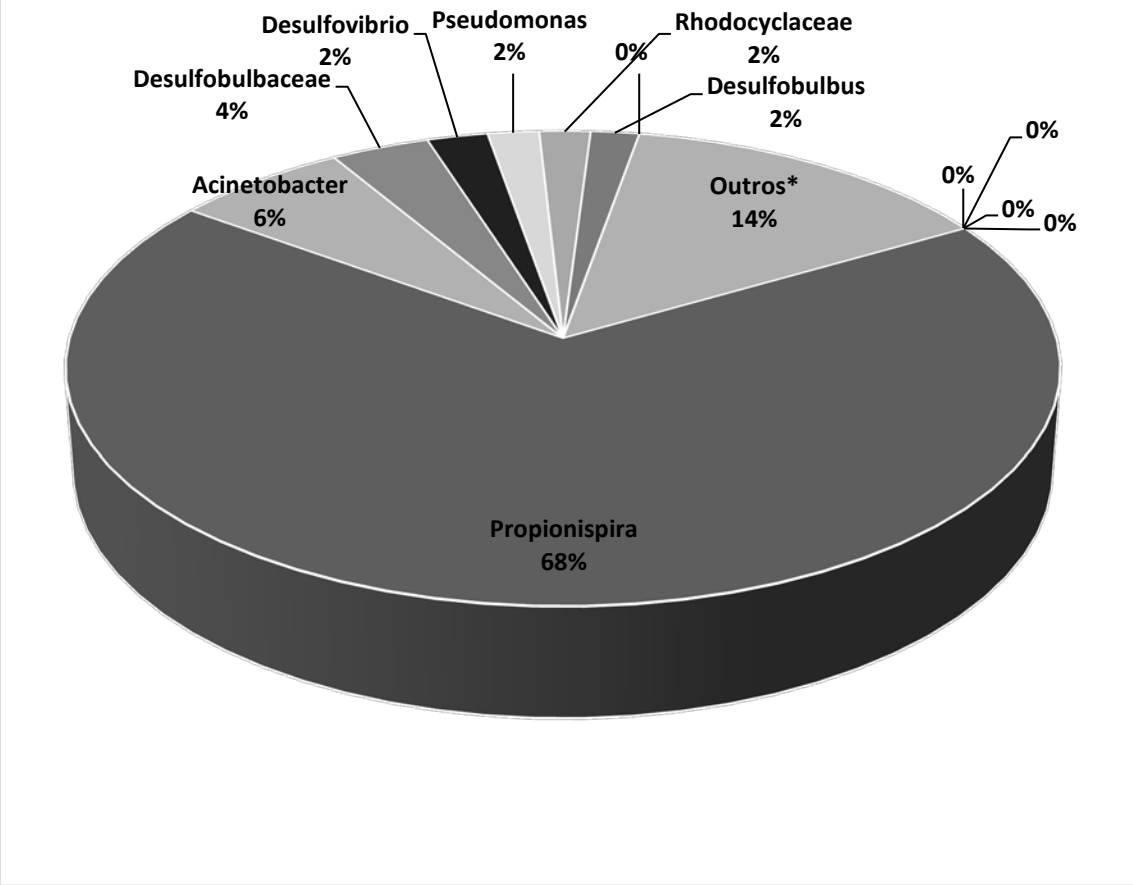
Figura 55 – Carboidratos em ensaio de recuperação do ferro com diferentes fontes de carbono (controle - nenhuma, sacarose, acetato, glicose e glicerol) todos na concentração de 0,277 mmol. Realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Foi feita análise da comunidade microbiana que remobilizou o ferro utilizando o glicerol como fonte de carbono. Através da técnica de sequenciamento de nova geração, os gêneros de bactérias identificados foram: Propionispira (68%), Acinetobacter (6%), Desulfobulbaceae (4%), Desulfovibrio (2%), Pseudomonas (2%), Rhodocyclaceae (2%) e Desulfobulbus (2%, Figura 56).

Figura 56 – Identificação das bactérias remobilizadoras do ferro utilizando glicerol como fonte de carbono (na concentração de 0,277 mmol).



Fonte: ORTIZ, 2018.

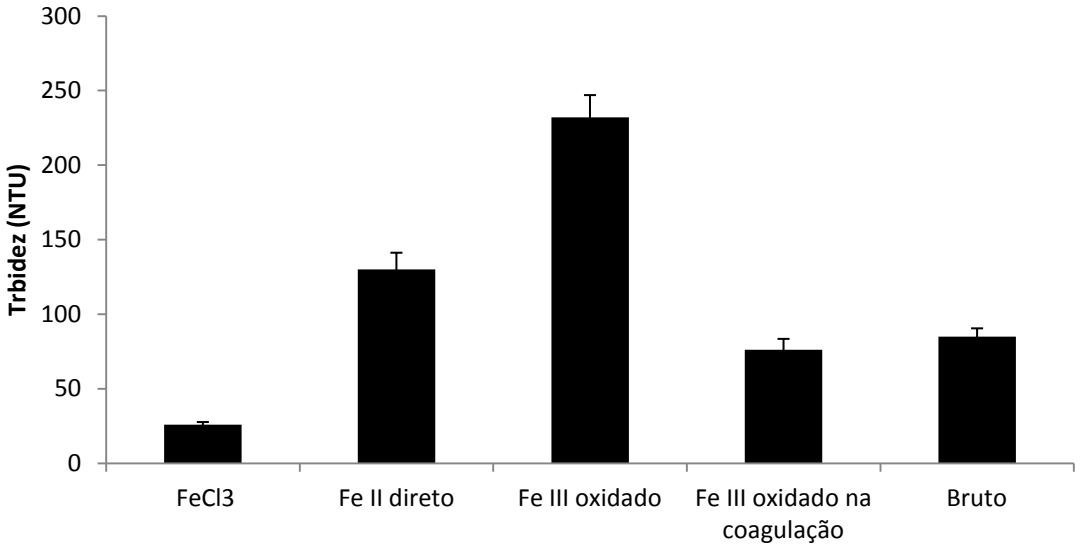
4.3.5 Aplicação do ferro recuperado

Nos ensaios realizados para avaliar a eficácia coagulante do ferro recuperado para tratamento de água residuária, foi necessário filtrar o sobrenadante por membranas com porosidade de 3µm para remover material coagulado suspenso devido ao arraste causado pela formação de gases no interior do lodo de coagulação. O processo de recuperação microbiológica do coagulante solubiliza Fe (II), que pode ser usado diretamente como coagulante. Alternativamente, o Fe (II) pode ser oxidado para Fe (III) por meio de aeração das amostras filtradas com ar (aeração de 270 L/h).

Foi avaliada a eficiência de coagulação com os seguintes coagulantes em solução: Fe (II) recuperado adicionado diretamente em contato com a água residuária bruta, Fe (II) convertido em Fe (III) por meio da aeração por 10 minutos antes da coagulação e o Fe (II) convertido em Fe (III) por aeração no momento da coagulação, realizado em *Jar Test*. Como controle foram utilizados o $FeCl_3$ na concentração de 60 mg/L e a água residuária bruta. Nestes ensaios não ocorreu redução da turbidez da

amostra (Figura 57). Nos ensaios com Fe (II) direto e Fe (III) oxidado os valores de turbidez foram superiores aos valores de turbidez da água residuária bruta.

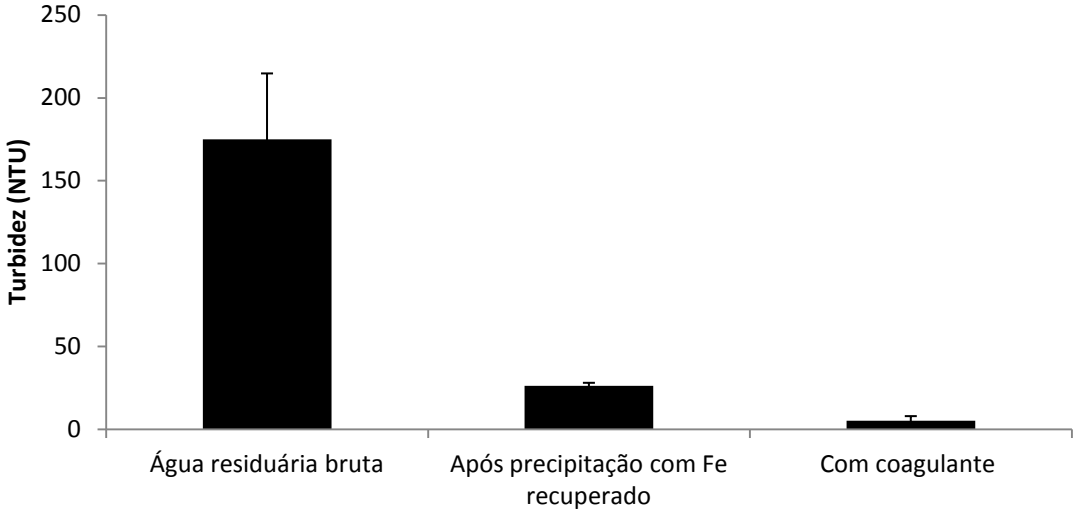
Figura 57 – Ensaio de coagulação utilizando as diferentes formas férricas do ferro reciclado. As formas férricas testadas foram $FeCl_3$ (sal), Fe (II) direto (reciclado), Fe (III) oxidado (reciclado), Fe (III) oxidado na coagulação (reciclado) e a amostra de água residuária bruta (Bruto). Utilizou 60 mg/L de Fe.



Fonte: ORTIZ, 2018.

Avaliou-se também a forma insolúvel do ferro remobilizado, secando as amostras em estufa a 100ºC, antes e após a oxidação. O ferro remobilizado antes da oxidação (Fe II) foi descartado devido às condições que apresentou pegajoso, difícil de remoção do cadinho. Já o ferro remobilizado e em seguida seco (pó) reduziu a turbidez da água residuária do CRUSP em 85%, e em 98% para o coagulante $FeCl_3$ (novo), ambos na concentração de 400 mg/L de Fe (Figura 58). Esta diferença foi estatisticamente relevante ($p<0,05$).

Figura 58 – Avaliação da capacidade de coagulação do ferro recuperado e do coagulante novo em reduzir a turbidez da água residuária do CRUSP, na concentração de 400 mg/L de Fe. Realizado em triplicata.



Fonte: ORTIZ, 2018.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Remobilização biológica do coagulante a base de Fe

A literatura que trata da recuperação do coagulante de lodos originados no tratamento de esgoto contém somente relatos de procedimentos químicos ou físicos para realizar tal recuperação. Neste ponto, este trabalho é inovador ao realizar a recuperação do coagulante que foi utilizado no tratamento de água residuária através de processo biotecnológico. Ivanov e colaboradores (2009) relatam o emprego de bactérias redutoras de ferro para mobilizar o ferro solúvel a partir de minério de ferro, para então utilizá-lo como coagulante no tratamento de águas residuárias.

Em comparação com a recuperação de coagulantes utilizando compostos químicos, a recuperação microbiana, obtida neste trabalho, se mostrou mais eficaz por não depender da acidificação do meio para que o ferro coagulado seja remobilizado pelas bactérias. Por exemplo, a recuperação ácida de coagulantes em lodos contendo hidróxido de ferro [$Fe(OH)_3$], segundo Pigeon e colaboradores (1978), além de apresentar uma eficiência de aproximadamente 50%, é mais complexa: é necessário baixar o pH (em torno de pH =2) e reduzir o Fe (III) para Fe (II), aumentando assim a

solubilidade e, consequentemente, facilitando a recuperação do ferro presente no lodo. Em seguida, utilizam-se oxidantes para obter novamente o Fe (III).

Outro aspecto no qual a recuperação microbiana do coagulante se mostrou mais eficiente foi a baixa remobilização de metais pesados. Estes metais são comumente solubilizados quando realizada a recuperação de coagulantes utilizando compostos químicos (XU *et al.*, 2009; AWWA, 1987). A remobilização ácida, por exemplo, solubiliza tanto o elemento de interesse como também metais considerados tóxicos à saúde humana e ao meio ambiente, como chumbo, manganês e cromo (XU *et al.*, 2009). A concentração de metais presentes no efluente irá depender de cada amostra, do seu local e da característica do lodo (ANDREOLI *et al.*, 2001). A regulamentação quanto às concentrações máximas de chumbo permitidas irá depender da legislação de cada país ou estado. Por exemplo, na Alemanha a concentração máxima permitida é de 0,04 mg/L. No estado do Arizona (EUA), são permitidos 0,02 mg/L de chumbo. No Brasil, a concentração permitida depende da origem da água: 0,03 mg/L para a água doce e 0,01 mg/L para a água salobra (MELO *et al.*, 2004).

Nesta pesquisa não foram levantados os dados de redução do volume do lodo após a recuperação do coagulante. Xu e colaboradores (2009) constataram uma redução de 35,5% do lodo descartado ao realizarem a remobilização ácida, um indicativo de como a remobilização microbiana, assim como a ácida, pode reduzir os gastos com transporte e descarte do lodo em aterros sanitários.

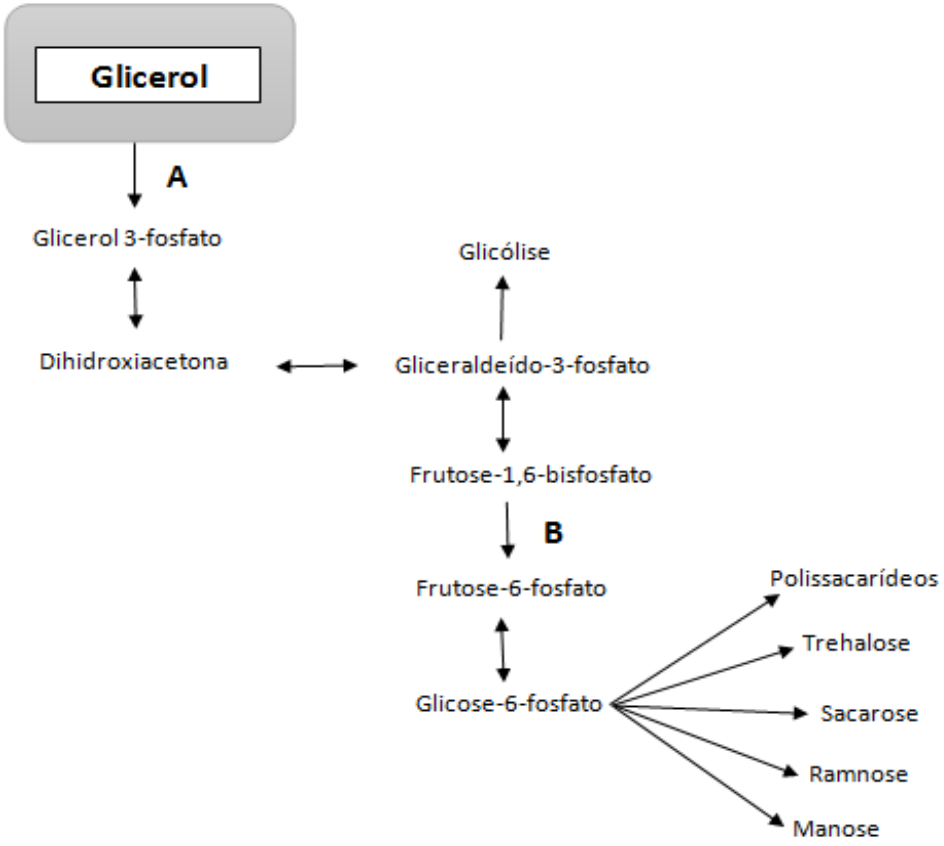
Um fator adicional que contribui para a diminuição da quantidade de lodo após a remobilização microbiana de coagulantes com bactérias redutoras de ferro é o consumo de matéria orgânica no processo. Nesta pesquisa,foi constatada redução de 50% dos compostos orgânicos da fração coagulada presentes na água residuária. Segundo De Morais e colaboradores (2017) é possível reduzir entre 70% e 90% da matéria orgânica no processo de biodigestão anaeróbia, gerando também fertilizante orgânico de ótima qualidade e metano.

Visando uma melhoria na eficácia da remobilização do coagulante pelas bactérias, e tomando por base que outros trabalhos adicionaram fontes de carbono ao tratar da redução do ferro por bactérias, esta pesquisa avaliou as seguintes fontes e seu comportamento com o grupo microbiano presente nas amostras de água residuária do CRUSP: glicose, sacarose, glicerol e acetato. Logo num primeiro momento, após os primeiros ensaios, descartaram-se a sacarose e o acetato por terem apresentado menor eficácia em termos de produção de ferro.

A glicose é uma fonte de carbono muito rica em energia e que muitos microrganismos utilizam como doador de elétrons, o que a tornaria a fonte ideal. No entanto, verificou-se que ela foi rapidamente degradada, provavelmente devido a uma competição entre os diversos microrganismos por esta fonte de carbono, e consequentemente as bactérias redutoras de ferro não aumentaram a redução de Fe.

Assim, o glicerol se mostrou a melhor fonte de carbono para melhorar a atuação das bactérias redutoras de ferro, pois para ser degradado ele exige determinadas enzimas que não estão presentes em todos os microrganismos, o que diminui a competição por esta fonte. Segundo Amaral e colaboradores (2009) as enzimas necessárias para utilizar o glicerol como fonte de energia ou como precursores de moléculas são: glicerol quinase e frutose-1,6-bifosfatase, apresentadas na figura 59.

Figura 59 – Enzimas necessárias para utilizar o glicerol como fonte de energia ou como precursos de moléculas. A - glicerol quinase. B - frutose-1,6-bisfosfatase



. **Fonte:** Amaral *et al*., 2009; Syldatk e Wagner, 1987.

Outro motivo que reforça a escolha do glicerol é o fato de que sua disponibilidade vem aumentando no mercado brasileiro de biocombustível (TABOSA *et*

al., 2009; CARNEIRO, 2015), o que o torna uma boa opção em termos de economia. Segundo Amaral e colaboradores (2009), durante a produção de biodiesel nacional, o glicerol é um dos produtos gerados que até então não possuía aplicação e preocupava a saúde ambiental, devido ao descarte do excesso deste produto altamente poluidor. A cada 10 quilos de biodiesel produzido, é gerado 1 quilo de glicerol (AMARAL *et al*., 2009). Cabe ressaltar, no entanto, que este glicerol possui impurezas, como triglicerídeos não convertidos, metanol não convertido, sabonetes e outros contaminantes (MEHER *et al*., 2006).

As origens do glicerol podem ser tanto de gordura animal, quanto óleos vegetais (TAMPANES *et al*., 2013). Seu custo médio no mercado é de 10 reais por litrode glicerol puro (Casa da Química Maringá), enquanto que o custo da glicose é de 35 reais o quilo (Shop Medclean). Quando comparado o valor por quilo de glicerol e glicose, conclui-se que o glicerol é mais barato. Em ensaios futuros, recomenda-se avaliar o quanto de glicerol e glicose foram consumidos para comparar o rendimento de cada fonte de carbono durante a utilização pelos microrganismos.

As bactérias redutoras de ferro também foram capazes de remobilizar o Fe em 40% na ausência de fontes de carbono externas e 58% na presença de glicerol: uma diferença de 18%. Isto significa que, mesmo sem a otimização da remobilização realizada com a adição de fontes de carbono, o processo de remobilização do coagulante é promissor. Neste caso, não haveria aumento de custo no processo, e as bactérias poderiam utilizar a própria matéria orgânica da água residuária.

Após o enriquecimento de bactérias redutoras de ferro constatou-se que não houve alterações entre o grupo bacteriano enriquecido e o não enriquecido. Portanto neste trabalho, bactérias da própria amostra, recém-coletadas de água residuária, podem ser utilizadas diretamente nos ensaios de remobilização do coagulante.

4.4.2 Análise do sal de $FeCl_3$ utilizado como coagulante

Entre os diferentes coagulantes a base de ferro avaliados, o melhor resultado foi obtido com $FeCl_3$, na concentração de 60 mg/L de Fe. Estas análises foram feitas em água residuária do CRUSP, para a qual o $FeCl_3$ apresentou uma alta remoção da turbidez, sem haver alteração na coloração do sobrenadante.

Em primeiro lugar, é importante levar em conta os valores de turbidez para a escolha do coagulante. Um segundo critério utilizado para a escolha do coagulante foi o seu possível uso em CEPT (Chemical Enhanced Primary Treatment). Isto porque, com

o surgimento de CEPT, os coagulantes passaram a ser adotados no primeiro momento do tratamento da água residuária. Atualmente, os coagulantes mais utilizados em tratamento de águas residuárias são $Al_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$ e polímeros orgânicos (SILVA, 2009; XU *et al*., 2009; LEE *et al*, 2014; BRATBY, 2016).

De fato, ainda são poucos os trabalhos publicados que utilizaram $FeCl_3$ como coagulante em tratamento CEPT. Um deles foi descrito por Olive (2002), que destaca a importância da adoção do tratamento CEPT em cidades litorâneas no Brasil. Na cidade analisada por ele, Riveira de São Lourenço, a população de aproximadamente 20 mil habitantes, chega a alcançar 80 mil ou mais durante o verão. Graças à adoção da CEPT, a planta possui capacidade de atender um fluxo médio de 8,400m^3 por dia, o que ocasiona na redução de 85% de sólidos suspensos totais e de 60% da DQO. A concentração de $FeCl_3$ utilizada era de 50 mg/L e 0,5 mg/L de um polímero aniônico sintético, e após o tratamento o efluente era lançado no mar. Lin e colaboradores (2017) também utilizaram $FeCl_3$ (20 mg de Fe/L) como coagulante em CEPT, removendo 75,6% de poluentes orgânicos e 99,3% de fosfato.

No mesmo estudo, feito com o objetivo de avaliar a degradação do lodo em biodigestores após o tratamento de CEPT (LIN *et al*., 2017), analisou-se a utilização tanto de PACl, como de $FeCl_3$ como coagulantes, e foi constatada degradação de uma elevada quantidade de matéria orgânica com $FeCl_3$,mas não com PACl. Além disso, neste trabalho, verificou-se a liberação de fosfato, um fato importante, considerando a possibilidade de uso deste composto como fertilizante. O $FeCl_3$ se liga no fosfato no momento da coagulação, mas durante a biodigestão do lodo, o fosfato que encontra-se ligado no Fe é liberado novamente, após redução do Fe (III) pelas bactérias redutoras de ferro.

O terceiro critério de escolha do $FeCl_3$ como coagulante foi a possibilidade de recuperação do coagulante, descrita no tópico anterior: o Fe (III) pode ser remobilizado na forma de Fe (II), que posteriormente pode ser oxidado novamente para Fe (III). Existe a possibilidade de realizar o processo inverso, utilizando o Fe (II) como coagulante e recuperando-o como Fe (III), porém foi escolhido o Fe (III) como coagulante devido à maior eficiência de sais trivalentes na coagulação quando comparado com sais divalentes, além de que sais de Fe (III) são mais efetivos do que sais de alumínio. Segundo Katsiris e colaboradores (1987), isto se deve às cargas negativas do lodo que necessitam de maior quantidade de coagulantes para

desestabilizá-los. Ainda outro motivo norteou esta decisão: a capacidade do Fe (III) de ser reduzido por microrganismos em condições anaeróbias.

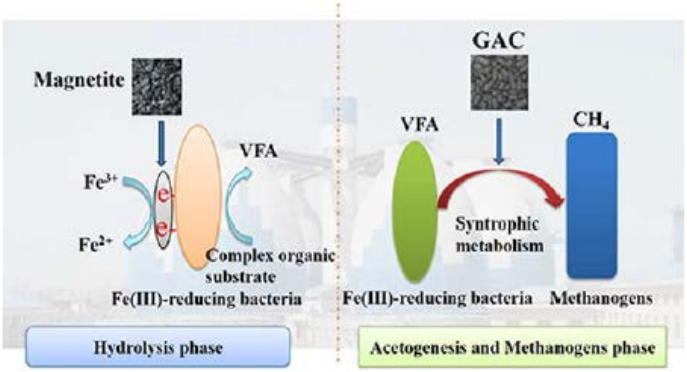
Por último, o $FeCl_3$ foi escolhido por uma questão econômica. Segundo Lin e colaboradores (2017), o custo em CEPT, utilizando $FeCl_3$ é quase insignificante em relação ao custo total do tratamento de água residuária: o custo com $FeCl_3$ é de aproximadamente HK$ 4,5/kg de Fe, o custo com CEPT é de $ 0,09/m^3 de esgoto e o custo total em uma ETE é de $ 2,5/m^3 de esgoto. Segundo o autor, o tratamento utilizando CEPT é simples e fácil de adotar, além de que o lodo gerado pode ser fermentado e remobilizar o fosfato.

4.4.3 Produção de metano

O processo de recuperação do coagulante Fe (III) com bactérias redutoras de ferro, além de regenerar o coagulante na forma de Fe (II), também produziu gás metano (biogás). Há um interesse econômico neste fato, já que a sua liberação no tratamento anaeróbio de efluente doméstico produz uma fonte de energia. Além disso, desde que haja uma destinação para este biogás, reduz-se o impacto ambiental, ao evitar que ele seja liberado diretamente na atmosfera.

Peng e colaboradores (2018) verificaram que a adição de magnetita em lodo de ETE aumentava a produção de metano e acelerava a degradação da matéria orgânica. Isto ocorre porque, durante a digestão anaeróbia, óxidos de Fe (III) promovem a decomposição da matéria orgânica complexa por bactérias redutoras de ferro (BAEK *et al*., 2015) e, portanto, favorecem a atividade de metanogênicas (Figura 60).

Figura 60 – Associação de bactérias redutoras de ferro com metanogênicas.



Fonte: Peng *et al*., 2018.

Cruz Viggi e colaboradores (2014) também observaram um aumento na produção de metano na presença de magnetita. Eles utilizaram propionato como fonte de carbono e obtiveram um aumento de 33% na produção do gás.

Segundo AlSayed e colaboradores (2018), em uma estação de tratamento de água residuária, dentre os gases gerados, 70% são de metano. AlSayed estimou que na América do Norte são produzidos cerca de 3,90 bilhões de metros cúbicos de metano por ano em ETE.

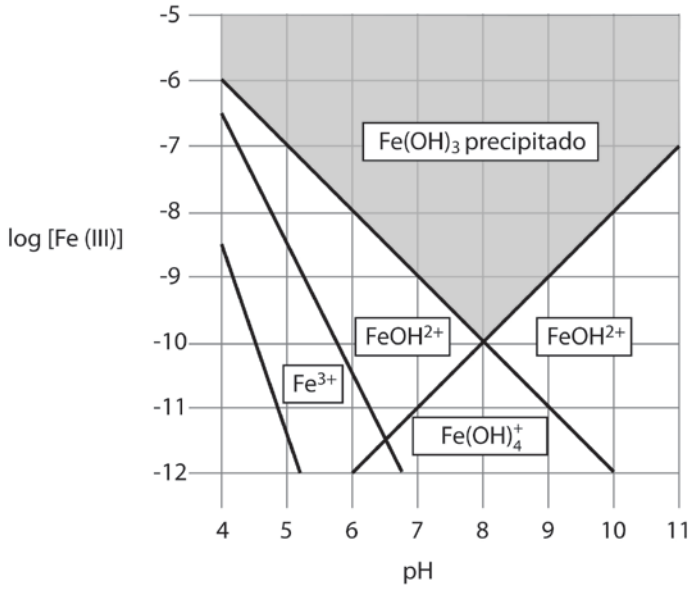
4.4.4 Aplicação do ferro remobilizado

A coagulação do lodo do tratamento de água residuária, feita por meio do ferro, pode ser realizada utilizando as espécies de Fe (II) ou Fe (III). Ao realizar esta pesquisa, a conclusão a que se chegou foi que a espécie mais eficaz foi o Fe (III), e por este motivo o Fe (II) obtido após a remobilização bacteriana foi oxidado por meio de aeração. Segundo Brady (2013), quando o Fe (II) é oxidado por meio de aeração, a forma encontrada de Fe (III) é FeOOH, conforme equação: $2FeO + 2H_2O \rightarrow 2FeOOH + 2H^+ + 2e^-$.

O coagulante, remobilizado após a primeira coagulação, permitiu remover85% de turbidez utilizando uma concentração de 400 mg/L de ferro remobilizado, oxidado e seco em estufa. A tentativa de realizar a mesma coagulação com o ferro remobilizado e solúvel utilizando a concentração de 60 mg/L, tanto na espécie Fe (II) como na espécie Fe (III – obtido após a oxidação),não resultou em remoção de turbidez, possivelmente devido à formação de diferentes espécies de ferro durante a remobilização bacteriana. Segundo Manahan (2016), na presença do íon hidrogênio e em um meio ácido redutor, a espécie predominante é do íon Fe (II), comum em alguns tipos de águas subterrâneas. Entretanto, na presença de sulfato e carbonato, a solubilidade do Fe (II) fica restrita devido à precipitação do FeS ou $FeCO_3$. Já em ambientes contendo atividade alta do íon hidrogênio e em meio ácido oxidante, a espécie predominante é Fe (III). A espécie $Fe(OH)_3$ sólido existe em meio oxidante de baixa acidez, e a espécie $Fe(OH)_2$ ocorre em meio redutor básico, com baixa atividade do íon hidrogênio e de elétrons. Como a água residuária possuía outros elementos químicos, possivelmente boa parte da espécie de Fe (II) remobilizada pelas bactérias redutoras de ferro já estava associada com outros elementos, impossibilitando a atuação total do ferro remobilizado como coagulante. Portanto, para alcançar um resultado satisfatório de coagulação com o ferro recuperado, seriam necessárias concentrações elevadas deste ferro.

A forma como o ferro será encontrado após ser utilizado pelas bactérias redutoras de ferro irá depender do valor do pH da água após a adição do coagulante. Segundo Calijuri e Cunha (2013), assim que é adicionado à água, o sal de ferro se hidrolisa e forma uma série de produtos da hidrólise, como espécies ionizadas e precipitados insolúveis de hidróxido de ferro [$Fe(OH)_3$], como mostra a figura 61. Portanto, a alcalinidade natural da água possui um papel fundamental no processo de formação do precipitado de hidróxido e das espécies solúveis hidrolisadas de ferro.

Figura 61 – Diagrama de solubilidade do hidróxido de ferro em água.



Fonte: Calijuri e Cunha (2013) adaptado de AWWA (2010).

4.4.5 Análise da comunidade bacteriana

Utilizando a técnica de sequenciamento de nova geração foram identificados os gêneros presentes nas amostras que continham glicerol como fonte de carbono. Os gêneros ativos encontrados neste trabalho foram: Propionispira, Acinetobacter, Desulfobulbaceae, Desulfovibrio, Pseudomonas, Rhodocyclaceae e Desulfobulbus.

A capacidade de reduzir o Fe (III) já foi descrita para alguns gêneros encontrados na amostra de água residuária do CRUSP após a remobilização do Fe coagulado. O gênero Desulfobulbacea e possui habilidade de utilizar o sulfato e o Fe (III) como aceptores de elétrons (HOLMES *et al*., 2004). Os gêneros Desulfovibrio e Desulfobulbus incluem bactérias redutoras de sulfato com capacidade de reduzir Fe (III), as bactérias descritas são *Desulfobulbus propionicus* e *Desulfovibrio desulfuricans*

(LOVLEY *et al*., 1993). O gênero Pseudomonas é capaz de reduzir o Fe (III) presente em petróleo bruto (OBUEKWE *et al*., 1982). O gênero Rhodocyclaceae possui a capacidade de utilizar ferridrita ou goetita como aceptor final de elétrons, utilizando acetato como doador de elétrons (LI e PENG, 2011). O gênero Acinetobacter foi descrito como redutor de ferro quando enriquecido com citrato férrico (PAN *et al*., 2017). Até o momento, o gênero Propionispira apresentou maior representatividade com 68%, e não existem publicações que descrevam a capacidade de reduzir ferro. A bactéria *Propionispira arboris* já foi descrita como capaz de fixar nitrogênio em anaerobiose (SCHINK *et al*., 1982).

Os gêneros encontrados neste trabalho, que possuem a capacidade de reduzir Fe durante a digestão anaeróbia, são os responsáveis por quebrar a matéria orgânica complexa e liberar compostos orgânicos menos complexos, favorecendo a atividade de metanogênicas (LIN *et al*., 2017; BAEK *et al*., 2015).

4.5 CONCLUSÃO

Bactérias redutoras de ferro são capazes de remobilizar o ferro coagulado, utilizado no tratamento de águas residuárias. Até o momento, o reinóculo destas bactérias não apresentou aumento na remobilização. O consumo de carboidratos, oriundos da própria amostra, foi de 200 mg/L e a remobilização foi de 29% de Fe. Os maiores teores de remobilização foram obtidos com diferentes fontes de carbono, entre as quais o glicerol obteve maior destaque. Utilizando glicerol como fonte de carbono, a recuperação do ferro foi de 58%. É importante destacar que a remobilização biológica não remobiliza metais pesados, diferente da recuperação ácida que solubiliza. Não é necessário alterar os valores de pH para obter melhores condições para as bactérias redutoras de ferro, o que torna menor o custo de operação.Durante a remobilização do ferro houve a produção do metano, gás de interesse econômico.

Não houve diferença estatística entre as concentrações de 40 e 60 mg/L de Fe para remoção de sólidos. A escolha da concentração foi determinada pela remoção da turbidez e o melhor coagulante para água residuária do CRUSP foi o $FeCl_3$ na concentração de 60 mg/ L de Fe, removendo 99% da turbidez, 98% do fosfato, 85% dos

carboidratos e 100% de proteínas presentes na água residuária. Porém, confirmou-se que o $FeCl_3$ não possui ação coagulante para o nitrogênio e a amônia.

O Fe remobilizado e mantido em solução (60 mg/L) não apresentou boa remoção da turbidez, não ultrapassando 8%. Já o ferro remobilizado, oxidado e seco, apresentou grande remoção da turbidez (85%), quando utilizado com elevada concentração (400 mg/L). Neste caso, apesar da concentração elevada, se trata de um coagulante remobilizado e recuperado, não exigindo custo adicional. Além disso, diminui a concentração do coagulante que será descartado como lodo em aterro sanitário. Portanto, a recuperação do coagulante é viável utilizando microrganismos da própria amostra e com um custo menor na recuperação, quando comparado com o custo dos reagentes químicos utilizados na remobilização ácida.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.** 2003.

ALSAYED, A.; FERGALA, A.; KHATTAB, S.; ELDYASTI, A. Kinetics of Type I Methanotrophs Mixed Culture Enriched From Waste Activated Sludge. **Biochemical Engineering Journal.** 2018.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing,** *87*(3), 179-186. 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. **American Public Health Association**, Washington DC, 1220p. 2005.

AMUDA, O. S.; ALADE, A. Coagulation/flocculation process in the treatment of abattoir wastewater. **Desalination**, *196*(1), 22-31. 2006.

ANDRAKA, D.; DZIENIS, L.; MYRZAKHMETOV, M.; OSPANOV, K. Application of Natural Zeolite for Intensification of Municipal Wastewater Treatment. **Journal of Ecological Engineering,** *18*(2), 175-181. 2017.

ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M. FERNANDES, F. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. **In: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Vol. 6. DESA/UFMG. 2001.

APHA, A. WPCF, Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association**/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA. 1995.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22nd edition. American Public Health Association, Washington, D.C. 2012.

AYOUB, M.; AFIFY, H.; ABDELFATTAH, A. Chemically enhanced primary treatment of sewage using the recovered alum from water treatment sludge in a model of hydraulic clari-flocculator. **Journal of Water Process Engineering,** *19*, 133-138. 2017.

BAEK, G.; KIM, J.; CHO, K.; BAE, H.; LEE, C. The biostimulation of anaerobic digestion with (semi) conductive ferric oxides: their potential for enhanced biomethanation. **Applied microbiology and biotechnology**, *99*(23), 10355-10366. 2015.

BAKAR, A. F. A.; HALIM, A. A. Treatment of automotive wastewater by coagulation-flocculation using poly-aluminum chloride (PAC), ferric chloride (FeCl 3) and aluminum sulfate (alum). In **AIP Conference Proceedings.** Vol. 1571, No. 1, pp. 524-529. AIP. 2013.

BARRY, R. C.; SCHNOOR, J. L.; SULZBERGER, B.; SIGG, L.; STUMM, W. Iron oxidation kinetics in an acidic alpine lake. **Water Research**,28(2), 323-333.1994.

BINGJIE, O.;XIANCAI, L.; HUAN, L.; JUAN, L.;TINGTING, Z.; XIANGYU, Z.; RUCHENG, W. Reduction of jarosite by *Shewanella oneidensis* MR-1 and secondary mineralization. **Geochimica et Cosmochimica Acta**,*124*, 54-71.2014.

BOKULICH, N. A.; SUBRAMANIAN, S.; FAITH, J. J.; GEVERS, D.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R.; CAPORASO, J. G. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing.**Nature methods**,10(1), 57. 2013.

BOND, A. M.; CANTERFORD, J. H. Alternating current polarographic method of analysis in the presence of oxygen and other irreversibly reduced species. **Analytical Chemistry,** 43.2: 228-234. 1971.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, *72*(1-2), 248-254. 1976.

BRADY, N. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. Nyle C. Brady, Ray R. Weil; tradução técnica: Igo Fernando Lepsch. 2013.

BRASIL - Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água.** Manual de bolso. 3ª Ed. rev. Brasília, 2009.

BRATBY, J. Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment.IWA publishing. 2016.

BRAUNSCHWEIG, J.; BOSCH, J.; HEISTER, K.; KUEBECK, C.; MECKENSTOCK, R. U. Reevaluation of colorimetric iron determination methods commonly used in geomicrobiology. **Journal of microbiological methods**, *89*(1), 41-48. 2012.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M. D.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Quim. Nova, 37**(3), 564-573.2014.

BRIDGE, T.A.M.; JOHNSON, D.B. Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron-containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2181-2186, 1998.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of microorganisms**. 6 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall.1991.

CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. **Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão.** Vol. 1. Elsevier Brasil. 2013.

CARNEIRO, R. B. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente.** Dissertação. São Carlos. SP. Universidade de São Paulo. 2015.

CASTRO, L.;GARCÍA-BALBOA, C.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, M. L.; MUÑOZ, J.A. Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances. Hydrometallurgy. Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances.**Hydrometallurgy**. 2013.

CHAGNON, F.; HARLEMAN, D. R. Na Introduction to Chemically Enhanced Primary Treatment. **Massachusetts Institute of Technology (Publisher), Cambridge (MA).** 2002.

CHEMCOM - Chemistry in the Community. 4ª ed. Nova Iorque: W.H. Freeman, 2001.

CONAMA, R. 357, de 17 de março de 2005. **Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**, *357*.2005.

CONAMA, R. 430, de 13 de maio de 2011. **Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**, *430*.2005.

COOKSON, J.T. **Bioremediation engineering: design and application**. McGraw-Hill, pp 525. 1995.

CRUZ VIGGI, C.; ROSSETTI, S.; FAZI, S.; PAIANO, P.; MAJONE, M.; AULENTA, F. Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation. **Environmental science & technology**, 48(13), 7536-7543. 2014.

CUMMINGS, D.E.; CACCAVO JR, F.; SPRING, S.; ROSENZWEIG, R. F. *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe (III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. **Archives of Microbiology**, v. 171, n. 3, p. 183-188, 1999.

DANDOLINI, I. **Reciclagem do lodo de estação de tratamento de água: produção de coagulante por lixiviação ácida**. 2014.

DE MORAIS, A. M. P.; SANTOS, A. A. O.; NETO, J. A. F.; DA SILVA, G. S. Proposta Tratamento do Esgoto por Meio De Biodigestores antes do seu Lançamento na Bacia do Riacho do Silva. **Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT-ALAGOAS**, 4(2), 165. 2018.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**,26(1), 81-89. 2003.

DE SOUZA, K. M. Tratamento de água industrial uma revisão e atualização dos processos envolvidos na indústria química. 2007.

DETHLEFSEN, F.; MECKENSTOCK, R.; VEEHMAYER, M. K.; DAHMKE, A. Determination of bioavailable Fe (III) content in column experiments with the reactive tracer phosphate. **Environmental Geology**, v. 46, n. 6-7, p. 896-904, 2004.

DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral. Economia Mineral do Brasil – 2009. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=1461> Acesso: 09 abr. 2014.

DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral. Economia Mineral do Brasil – 2014. Disponível em: <https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=8985> Acesso: 23 jan. 2015.

DO CARMO C. M.; CUNHA, D. G. F. **Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão.** Vol. 1. Elsevier Brasil. 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**,*28*(3), 350-356.1956.

EISELE, T.C. Direct biohydrometallurgical extraction of iron from ore final technical report. **Department of Chemical Engineering Michigan Technological University**. 2005.

FAHIM, F. A.; FLEITA, D. H.; IBRAHIM, A. M.; EL-DARS, F. M. Evaluation of some methods for fish canning wastewater treatment. **Water, Air, SoilPollution**, 127(1), 205-226. 2001.

FIGUEIREDO, I. C.; JORDÃO, E. P.; JUNIOR, I. V.; DEZOTTI, M.; AZAVEDO, J. P. S. II – 030 – Desempenho de produtos químicos no processo CEPT: Teste de jarro e escala piloto. **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 2005.

FOUAD, M. M.; EL-GENDY, A. S.; RAZEK, T. M. Evaluation of leached metals in recovered aluminum coagulants from water treatment slurry. **Water Science and Technology**, 75(4), 998-1006. 2017.

FREDRICKSON, J.K.; GORBY, Y.A. Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 287-294. 1996.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **XI MET**, 34.2006.

GHOSH, M. M.; O'CONNOR, J. T.; ENGELBRECHT, R. S. Bathophenanthroline method for the determination of ferrous iron. **Journal American Water Works Association**, *59*(7), 897-905. 1967.

GJESSING, E. T. Ferrous iron in water. **Limnol. Oceanog**., 9: 272-274.1964.

GONÇALVES, B. R. L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A. C. D. Glicerol: Uma inovadora fonte de energia proveniente da produção de biodiesel. In **International Workshop Advances in Cleaner Production**. 2009.

GONÇALVES, R. F. Projeto de pesquisa realizada pelo Departamento de Hidráulica e Saneamento da UFES – Programa Nacional de Pesquisa em Saneamento Básico (Prosab) da Finep/CNPq (edital 01/96), núcleo temático n.4: Subprojeto 2: Recuperação de coagulantes de lodos de ETAs para reutilização no tratamento de águas e efluentes, 1999.

GONÇALVES, R. F.; BRANDÃO, J. T.; BARRETO, E. M. D. S. Viabilidade econômica da regeneração do Sulfato de Alumínio de Lodos de Estações de Tratamento de Águas. In **20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.** pp. 1298-1307.1999.

GRALNICK, J.A.; NEWMAN, D. Extracellular Respiration. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1-11, 2007.

GUIMARAES, N. C. Recuperação de coagulante a partir da acidificação de resíduos gerados na Estação de Tratamento de Água do Rio Manso. 2005.

GUIMARÃES, N. R.; FERREIRA FILHO, S. S.; HESPANHOL, B. P.; PIVELI, R. P. Evaluation of chemical sludge production in wastewater treatment processes. **Desalination and Water Treatment**, 1-7. 2015.

GUNNARS, A.; BLOMQVIST, S.; JOHANSSON, P.; ANDERSSON, C. Formation of Fe (III) oxyhydroxide colloids in freshwater and brackish seawater, with incorporation of phosphate and calcium.**Geochimica et Cosmochimica Acta**,66(5), 745-758.2002.

GUO, C. H.; STABNIKOV, V.; IVANOV, V. The removal of nitrogen and phosphorus from reject water of municipal wastewater treatment plant using ferric and nitrate bioreductions. **Bioresource technology**, *101*(11), 3992-3999.2010.

HAMAMURA, N.; OLSON, S. H.; WARD, D. M.; INSKEEP, W. P. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6316-6324, 2006.

HAYDAR, S.; AZIZ, J. A. Characterization and treatability studies of tannery wastewater using chemically enhanced primary treatment (CEPT) — a case study of Saddiq Leather Works. **Journal of Hazardous Materials**,*163*(2), 1076-1083. 2009.

HE, Q.; WANG, H.; XU, C.; ZHANG, W.; ZOU, Z.; YANG, K. Feasibility and optimization of wastewater treatment by chemically enhanced primary treatment (CEPT): a case study of Huangshi. Chemical Speciation & Bioavalability. v. 28. n. 1-4. p. 209-215. 2016.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; LARTER, S. R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 344-352, 2003.

HERLEMANN, D. P.; LABRENZ, M.; JÜRGENS, K.; BERTILSSON, S.; WANIEK, J. J.; ANDERSSON, A. F. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. The ISME Journal. v. 5, n. 10, p. 1571–1579, 2011.

HOLMES, D. E.; BOND, D. R.; LOVLEY, D. R. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe (III) and graphite electrodes. **Applied and Environmental Microbiology**,70(2), 1234-1237. 2004.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia. **Atlas de saneamento**. Diretoria de Geo ciências. 2011. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=280933>. Acesso em: 29 ago. 2017.

IVANOV, V.; KUANG, S.; STABNIKOV, V.; GUO, C. The removal of phosphorus from reject water in a municipal wastewater treatment plant using iron ore. **Journal of chemical technology and biotechnology**,*84*(1), 78-82.2009.

IVANOV, V.; STABNIKOV, V.; ZHUANG, W. Q.; TAY, J. H.; TAY, S. T. L. Phosphate removal from the returned liquor of municipal wastewater treatment plant using iron-reducing bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1152-1161, 2005.

JUNG, K. W.; AHN, K. H. Dual purpose recovered coagulant from drinking water treatment residuals for adjustment of initial pH and coagulation aid in electrocoagulation process. **Environmental technology**,*37* (13), 1605-1617. 2016.

KATSIRIS, N.; KOUZELI-KATSIRI, A. Bound water content of biological sludges in relation to filtration and dewatering.**Water Research**, 21 (11), 1319-1327. 1987.

KEELEY, J.; JARVIS, P.; JUDD, S. J. An economic assessment of coagulant recovery from water treatment residuals.**Desalination**, *287*, 132-137. 2012.

KEELEY, J.; SMITH, A. D.; JUDD, S. J.; JARVIS, P. Acidified and ultrafiltered recovered coagulants from water treatment works sludge for removal of phosphorus from wastewater. **Water research**,88, 380-388. 2016.

KING, G.M; GAREY. M.A. Ferric iron reduction by bacteria associated with the roots of freshwater and marine macrophytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4393-4398, 1999.

KOTEWICZ, M. L.; D'ALESSIO, J. M.; DRIFTMIER, K. M. Cloning and over expression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. Gene, v. 35, n. 3, p. 249-258, 1985.

KUMAR, S.; MITTAL, S. K.; KAUR, N.; KAUR, R. Improved performance of Schiff based ionophore modified with MWCNT for Fe (II) sensing by potentiometry and voltammetry supported with DFT studies.**RSC Advances**, *7* (27), 16474-16483. 2017.

LEAL, F. C. T.; LIBÂNIO, M. Estudo da remoção da cor por coagulação química no tratamento convencional de águas de abastecimento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 7(3), 117-128. 2002.

LEANG, C.; ADAMS, L. A.; CHIN, K. J.; NEVIN, K. P.; METHÉ, B. A.; WEBSTER, J.; LOVLEY, D. R. Adaptation to disruption of the electron transfer pathway for Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 5918-5926, 2005.

LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soil systems.**Earth-Science Reviews**, v. 51, n. 1, p. 1-31, 2000.

LEE, C. S.; ROBINSON, J.; CHONG, M. F. A review on application of flocculants in wastewater treatment.**Process Safety and Environmental Protection**, 92 (6), 489-508. 2014.

LEE, G. F.; STUMM, W. Determination of ferrous iron in the presence of ferric iron with bathophenanthroline.**Journal American Water Works Association**, 52 (12), 1567-1574.1960.

LIN, L.; LI, R. H.; LI, Y.; XU, J.; LI, X. Y. Recovery of organic carbon and phosphorus from wastewater by Fe-enhanced primary sedimentation and sludge fermentation**.Process Biochemistry**,*54*, 135-139. 2017.

LIU, C.; KOTA, S.; ZACHARA, J. M.; FREDRICKSON, J. K.; BRINKMAN, C. K. Kinetic analysis of the bacterial reduction of goethite. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 12, p. 2482-2490, 2001.

LIU, S. V.; ZHOU, J.; ZHANG, C.; COLE, D. R.; Gajdarziska-Josifovska, M.; Phelps, T. J. Thermophilic Fe (III)-reducing bacteria from the deep subsurface: the evolutionary implications. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1106-1109, 1997.

LIU, Y.; HUANG, L.; DONG, G.; LIU, G.; WU, X.; WANG, C.; WANG, L. Enhanced granulation and methane recovery at low load by down flow sludge circulation in anaerobic treatment of domestic wastewater. **Bioresource technology**,249, 851-857. 2018.

LOVLEY, D. R.; GIOVANNONI, S. J.; WHITE, D. C.; CHAMPINE, J. E.; PHILLIPS, E. J. P.; GORBY, Y. A.; Goodwin, S. *Geobacte rmetallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. **Archives of microbiology**, v. 159, n. 4, p. 336-344, 1993.

LOVLEY, D. R.; HOLMES, D. E.; NEVIN, K. P. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction.**Advances in Microbial Physiology**, v. 49, p. 219-286, 2004.

LOVLEY,D. R.; WOODWARD, J. C.; CHAPELLE, F. H.Simulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe (III) ligands. **Nature**,370: 128-131. 1994.

LOVLEY, D.R. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction**. Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 259, 1991.

LOVLEY, D.R. Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more.**Geobiology**, v. 6, n. 3, p. 225-231, 2008.

LOVLEY, D.R.; BAEDECKER, M.J.; LONERGAN, D.J.; COZZARELLI, I.M.; PHILLIPS, E.J.P.; SEIGEL, D.I. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. **Nature**, v. 339, n. 6222, p. 297-300, 1989.

LOVLEY, D.R.; PHILLIPS, E.J.P. Availability of ferric iron for microbial reduction inbottom sediments of the freshwater tidal Potomac River. **Appl. Environ. Microbiol**.52, 751–757.1986.

LOVLEY, D.R.; PHILLIPS, E.J.P. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1536-1540, 1987.

LOWER, S.K.; HOCHELLA, M.F.; BEVERIDGE, T. J. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and α-FeOOH. **Science**, v. 292, n. 5520, p. 1360-1363, 2001.

LUU, Y.S.; RAMSAY, J. A. Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe (III) as an energy source. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 215-225, 2003.

MACALADY, J.; BANFIELD, J. F. Molecular geomicrobiology: genes and geochemical cycling. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 209, n. 1, p. 1-17, 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P.**Microbiologia de BROCK**. Artmed, 2004.

MANAHAN, S. E. **Química ambiental.** Bookman Editora. 2016.

MARGUTI, A. L.; FILHO, S. S. F.; PIVELI, R. P. Otimização de processos físicos-químicos na remoção de fósforo de esgotos sanitários por processos de precipitação química com cloreto férrico. **Artigo Técnico**. Engenharia Sanitária Ambiental. v. 13. n. 4. p. 395 – 404. 2008.

MARSHALL, M. J.; BELIAEV, A. S.; DOHNALKOVA, A. C.; KENNEDY, D. W.; SHI, L.; WANG, Z.; FREDRICKSON, J. K. C-Type cytochrome-dependent formation of U (IV) nanoparticles by *Shewanella oneidensis*.**PLoS biology**, v. 4, n. 8, p. 268, 2006.

MASSCHELEIN, W. J.; DEVLEMINCK, R.; GENOT, J. The feasibility of coagulant recycling by alkaline reaction of aluminium hydroxide sludges.**Water Research**, 19 (11), 1363-1368. 1985.

MAZZUCO, L.M. **Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. 2004.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by trans esterification—a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, *10*(3), 248-268. 2006.

MELO, G. M. P.; MELO, V. P.; MELO, W. J. Metais pesados no ambiente decorrente da aplicação de lodo de esgoto em solo agrícola. **BRASIL. Ministério do Meio**

Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Processos. Brasília: MMA, CONAMA. 2004.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. McGraw Hill Brasil. 2015.

MORADIHAMEDANI, P.; ABDULLAH, A. H. High-performance cellulose acetate/polysulfone blend ultrafiltration membranes for removal of heavy metals from water.**Water Science and Technology**,75(10), 2422-2433. 2017.

MORGAN, B.; LAHAV, O. The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe (II) oxidation by O_2 in aqueous solution–basic principles and a simple heuristic description.**Chemosphere**, 68.11: 2080-2084. 2007.

MOTA L.; DI VITTA P.B. Química forense: utilizando métodos analíticos em favor do poder judiciário. **Rev. Acad. Oswaldo Cruz** 1, 2014.

MYERS, C. R.; MYERS, J. M. Cell surface exposure of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1.**Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 254-258, 2003.

MYERS, C.; NEALSON, K. Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese (IV) and iron (III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. **J. Bacteriol.** 172, 6232–6238. 1990.

NAIR, A. T.; AHAMMED, M. M. Influence of sludge characteristics on coagulant recovery from water treatment sludge: a preliminary study. **Journal of Material Cycles and Waste Management**,19(3), 1228-1234. 2017.

NAVAS-MOLINA, J. A.; PERALTA-SÁNCHEZ, J. M.; GONZÁLEZ, A.; MCMURDIE, P. J.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; XU, Z.; ... HUNTLEY, J. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. In **Methods in enzymology.** vol. 531, pp. 371-444. Academic Press. 2013.

NEVIN, K. P.; HOLMES, D. E.; WOODARD, T. L.; HINLEIN, E. S.; OSTENDORF, D. W.; LOVLEY, D. R. *Geobacter bemidjiensis* sp. nov.and *Geobacter psychrophilus*

sp. nov., two novel Fe (III)-reducing subsurface isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1667-1674, 2005.

NEWMAN, D. K.; BANFIELD, J. F. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science Signaling**, v. 296, n. 5570, p. 1071, 2002.

NOUREDDINE, H.; FAKIH, M.; MAKHOUR, Y.; ZEINEDDINE, D.; BOUSSERRHINE, N. Co and Mn decrease chemical and biological reduction rate of iron oxyhydroxides.**Physics Procedia**,*21*, 211-219. 2011.

OBUEKWE, C. O.; WESTLAKE, D. W. S. Effects of medium composition on cell pigmentation, cytochrome content, and ferric iron reduction in a *Pseudomonas sp*. isolated from crude oil.**Canadian Journal of Microbiology**,28(8), 989-992. 1982.

OHMURA, N.; SASAKI, K.; MATSUMOTO, N.; SAIKI, H. Anaerobic respiration using Fe3+, S0, and H2 in the chemolitho autotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans.* **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 8, p. 2081-2087, 2002.

OKUDA, T.; NISHIJIMA, W.; SUGIMOTO, M.; SAKA, N.; NAKAI, S.; TANABE, K.;OKADA, M. Removal of coagulant aluminum from water treatment residuals by acid.**Water research**,60, 75-81. 2014.

OLIVE, N. **Design of a chemically enhanced primary treatment plant for the city of Alfenas, Minas, Gerais, Brazil.** Dissertation, Massachusetts Institute of Technology.2002.

PAN, Y.; YANG, X.; XU, M.; SUN, G. The role of enriched microbial consortium on iron-reducing bioaugmentation in sediments.**Frontiers in microbiology**, 8. 2017.

PAVANELLI, G. Eficiência de diferentes tipos de coagulantes na coagulação, floculação e sedimentação de água com cor ou turbidez elevada. **Dissertação**. São Carlos. p.223. 2001.

PENG, H.; ZHANG, Y.; TAN, D.; ZHAO, Z.; ZHAO, H.; QUAN, X. Roles of magnetite and granular activated carbon in improvement of anaerobic sludge digestion.**Bioresource technology**,249, 666-672. 2018.

PICARDAL, F.; ARNOLD, R. G.; HUEY, B. B. Effects of electron donor and acceptor conditions on reductive dehalogenation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* 200.**Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 8-12, 1995.

PIGEON, P. E.; LINSTEDT, K. D.; BENNETT, E. R. Recovery and reuse of iron coagulants in water treatment. **Journal-American Water Works Association**, *70*(7), 397-403. 1978.

PINTO, A. J.; RASKIN, L. PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. PLoS ONE. v.7, n. 8, 2012.

POURBAIX, M. **Lectures on electrochemical corrosion**. 1973.

QIN, J. J.; LI, Y.; LEE, L. S.; LEE, H. Cellulose acetate hollow fiber ultrafiltration membranes made from CA/PVP 360 K/NMP/water.**Journal of Membrane Science**,218(1), 173-183.2003.

RAO, G. G.; SOMIDEVAMMA, G. Volumetric determination of iron (III) with hydroxylamine as a reducing agent.**Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**,165(6), 432-436. 1959.

RAT'KO, A. I.; IVANETS, A. I.; SAKHAR, I. O.; DAVYDOV, D. Y.; TOROPOVA, V. V.; RADKEVICH, A. V. The retentiveness of ceramic microfiltration membranes with respect to ferric iron ions.**Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces,**48(5), 553-556.2012.

RÖLING, W. F., HEAD, I. M., & LARTER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects.**Research in Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 321-328, 2003.

ROSA, A.P. Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Macaé, RJ. 2001.

SANTANA-CASIANO, J. M.; GONZÁLEZ-DÁVILA, M.; MILLERO, F. J. Oxidation of nanomolar levels of Fe (II) with oxygen in natural waters.**Environmental science & technology**,39(7), 2073-2079. 2005.

SANTOS, J. F. D. **Desenvolvimento e avaliação do desempenho de flotador alternativo para tratamento de água residuária sintética da indústria de alimentos**.2008.

SCALA, D. J., HACHERL, E. L., COWAN, R., YOUNG, L. Y., & KOSSON, D. S. Characterization of Fe (III)-reducing enrichment cultures and isolation of Fe (III)-reducing bacteria from the Savannah River site, South Carolina.**Research in microbiology**, v. 157, n. 8, p. 772-783, 2006.

SCHINK, B.; THOMPSON, T. E.; ZEIKUS, J. G. Characterization of *Propionispira arboris* gen. nov. sp. nov.; a nitrogen-fixing anaerobe common to wetwoods of living trees.**Microbiology**,128(11), 2771-2779.1982.

SCHLOSS, P. D. The Effects of Alignment Quality, Distance Calculation Method, Sequence Filtering, and Region on the Analysis of 16S rRNA Gene-Based Studies. **PLoS ONE.** v.6, n.7, 2010.

SHAPIRO, J. On the measurement of ferrous iron in natural waters.**Limnology and Oceanography,**11(2), 293-298.1966.

SHI, L.; SQUIER, T. C.; ZACHARA, J. M.; e FREDRICKSON, J. K. Respiration of metal (hydr) oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes.**Molecular Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 12-20, 2007.

SILVA, C. L.; SILVA, A. L.; DE MEDEIROS, S. R.; LIMA, L. F.; e BLAHA, C. A. Detecção de bactérias redutoras de Fe (III), em mangue da bacia petrolífera potiguar com potencial biodegradador de petróleo. 2007.

SILVA, C. V. A. **Remoção de fósforo em estação compacta de tratamento de esgotos sanitários através de precipitação química.**Dissertação. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. p. 119. 2009.

SKORONSKI, E.; OHRT, A. C.; DE OLIVEIRA CORDELLA, R.; TREVISAN, V.; FERNANDES, M.; MIGUEL, T. F.; MARTINS, P. R. Using Acid Mine Drainage to Recover a Coagulant from Water Treatment Residuals. **Mine WaterandtheEnvironment**,36(4), 495-501. 2017.

SLOBODKIN, A. I. Thermophilic microbial metal reduction.**Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 501-514, 2005.

SLOBODKIN, A. I.; JEANTHON, C.; L'HARIDON, S.; NAZINA, T.; MIROSHNICHENKO, M.; e BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. Dissimilatory reduction of Fe (III) by thermophilic bacteria and archaea in deep subsurface petroleum reservoirs of Western Siberia.**Current Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 99-102, 1999.

STEPHENSON, R. J.; DUFF, S. J. Coagulation and precipitation of a mechanical pulping effluent—I. Removal of carbon, colour and turbidity.**Water research**,30(4), 781-792.1996.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. **Production of biosurfactant, in Biosurfactants and biotechnology**, Kosaric, N., Cairns, W.L., & Gary, N.C.C. (eds). Marcel Dekker, New York, USA. pp. 89–119. 1987.

TABOSA, M.; SOARES, L.; SAAVEDRA, G. Utilização do glicerol como fonte de carbono em fermentação submersa. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal/RN. 2009.

TAPANES, N. C.; ARANDA, D. A. G.; PEREZ, R. S.; CRUZ, Y. R. Biodiesel no Brasil: matérias primas e tecnologias de produção.**Acta Sci Tech**, 1(1), 119-125. 2013.

TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F. L. Wastewater engineering. **Management**, v. 7, p. 1-4, 1991.

THORPE, C. L.; MORRIS, K.; BOOTHMAN, C.; LLOYD, J. R. Alkaline Fe (III) reduction by a novel alkali-tolerant *Serratia* sp. isolated from surface sediments close to Sellafield nuclear facility, UK.**FEMS microbiology letters**, v. 327, n. 2, p. 87-92, 2012.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova** 27: 441-446. 2004.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63(7), 896-900. 2009.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**(Vol. 1). Editora UFMG. 2014.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**(Vol. 1). Editora UFMG. 2005.

WANG, X. J.; YANG, J.; CHEN, X. P.; SUN, G. X.; e ZHU, Y. G. Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China.**Journal of Soils and Sediments**, v. 9, n. 6, p. 568-577, 2009.

WANG, Y.; TNG, K. H.; WU, H.; LESLIE, G.; WAITE, T. D. Removal of phosphorus from wastewaters using ferrous salts–a pilot scale membrane bioreactor study.**Water research**,*57*, 140-150. 2014.

WEBER, K. A.; ACHENBACH, L. A.; e COATES, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction.**Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 752-764, 2006.

WITHERS, P.J.A.;JARVIE, H.P.;STOATE,C. Quantifying the impact of septic tank systems on eutrophication risk in rural headwaters**. Environment International.** vol. 37. n.3, p. 644-653. 2011.

XU, G. R.; YAN, Z. C.; WANG, Y. C.; WANG, N. Recycle of Alum recovered from water treatment sludge in chemically enhanced primary treatment.**Journal of Hazardous Materials,***161*(2), 663-669. 2009.

XU, Y.; HE, Y.; FENG, X.; LIANG, L.; XU, J.; BROOKES, P. C.; WU, J. Enhanced abiotic and biotic contributions to dechlorination of pentachlorophenol during Fe (III)

reduction by an iron-reducing bacterium *Clostridium beijerinckii* Z.**Science of the Total Environment,***473*, 215-223.2014.

YANG, L.; WEI, J.; ZHANG, Y.; WANG, J.; WANG, D. Reuse of acid coagulant-recovered drinking waterworks sludge residual to remove phosphorus from wastewater. **Applied Surface Science**. 305: 337-346. 2014.

YI, W.; WANG, B.; QU, D. Diversity of isolates performing Fe (III) reduction from paddy soil fed by different organic carbon sources. **African Journal of Biotechnology.** v. 11, n. 19, p. 4407-4417, 2012.

YOUSSEF, N.; SHEIK, C. S.; KRUMHOLZ, L. R.; NAJAR, F. Z.; ROE, B, A.; ELSHAHED, M. S. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing - generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. Applied Environmental Microbiology, v, 75, p. 5227–5236, 2009.