



**UNILASALLE**  
**CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE**



MESTRADO EM AVALIAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS  
EM MINERAÇÃO

SILVANO PEREIRA NAZIAZENO

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS EM  
LIQUÍDO DE ESCOAMENTO PARCIALMENTE TRATADO  
PROVENIENTE DE ATERRO SANITÁRIO**

CANOAS, 2012

SILVANO PEREIRA NAZIAZENO

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS EM  
LIQUÍDO DE ESCOAMENTO PARCIALMENTE TRATADO  
PROVENIENTE DE ATERRO SANITÁRIO**

Dissertação de Mestrado Acadêmico  
em Avaliação de Impactos Ambientais  
em Mineração apresentado à banca  
examinadora do Centro Universitário  
La Salle – UNILASALLE/Canoas-RS,  
para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Delmar Bizani

CANOAS, 2012

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

N335e Naziazeno, Silvano Pereira

Estudo da aplicação de linhagens bacterianas em líquido de escoamento parcialmente tratado proveniente de aterro sanitário [manuscrito]. / Silvano Pereira Naziazeno. – 2012.

84 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Avaliação de impactos ambientais em mineração) – Centro Universitário La Salle, Canoas, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. Delmar Bizani”.

1. Biorremediação. 2. Aterro sanitário. 3. Impacto ambiental. I. Bizani, Delmar. II. Título.

CDU: 628.472.3

Bibliotecária responsável: Melissa Rodrigues Martins - CRB 10/1380



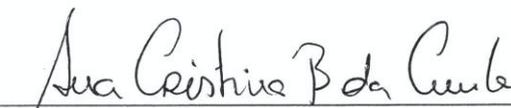
**UNILASALLE**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE



Credenciamento: Decreto de 29/12/98 - D.O. U. de 30/12/98  
Redeenciamento: Portaria 1.473 de 25/5/04 - D.O.U. de 26/5/04

**Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais em  
Mineração**

**BANCA EXAMINADORA**

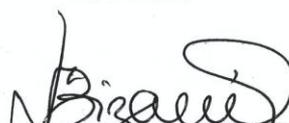
  
Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Ana Cristina Borba da Cunha  
UNILASALLE



Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Simone Schneider Amaral  
UNILASALLE



Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Vanusca Dalosto Jahno  
FEEVALE



Prof. Dr. Delmar Bizani  
Orientador e Presidente da Banca

**Área de Concentração:** Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração

**Curso:** Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração

Canoas, 23 de março de 2012.

## *DEDICATÓRIA*

*Dedico este trabalho a meus pais  
Sylvio Alves Naziazeno e Asselina Pereira Naziazeno pelos  
momentos de carinho e afeto que me ofereceram durante a existência.*

*(homenagem póstuma)*

*Á minha mãe adotiva, Maria Ondina Fabrício Barbosa, pelas suas palavras  
generosas e pelo seu incentivo, me encaminhando rumo ao futuro.*

*(homenagem póstuma)*

*Ao Mestre de Artes Marciais Akira Taniguchi pelo  
aprendizado e lições de vida durante nosso convívio.*

*(homenagem póstuma)*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus pela saúde e energia recebida, que permitiram vencer todos os obstáculos e alcançar meus objetivos;*

*A minha família, em especial aos meus filhos Thiago, Thaiane, Nathize; a minha neta Thainá e a todos meus irmãos, que sempre me apoiaram e souberam compreender a minha ausência;*

*Ao meu orientador Prof.Dr. Delmar Bizani, pela sua paciência, amizade e sabedoria;*

*A Elvania Luiz Cardoso colaboradora incansável na realização deste trabalho;*

*À Secretaria do Meio Ambiente do Município de Canoas – RS, através do Engenheiro André Luiz Arnhold, pelas informações prestadas e permissão ao acesso na área do Aterro Sanitário Guajuviras.*

*E a todos aqueles que de alguma forma tornaram possível este trabalho.*

## RESUMO

O avanço acelerado da industrialização e urbanização no Brasil, nas últimas décadas, gerou uma produção crescente de resíduos sólidos urbanos e industriais, bem como efluentes e lodos oriundos de tais processos. O confinamento de resíduos sólidos urbanos em aterros sanitários, produz percolados com alta toxicidade decorrente do teor elevado de matéria orgânica, metais pesados, nitratos e sulfatos. O tratamento desse percolado é necessário, antes de seu descarte, evitando impactos ambientais. Os bioprocessos são utilizados desde o início do século no tratamento de efluentes domésticos e industriais com alta carga orgânica, necessitando apenas do ajuste de alguns parâmetros como o pH e temperatura, considerando que são variáveis importantes no processo de biotratamento. A biorremediação é uma técnica alternativa que se caracteriza por ser natural, por implicar num investimento mínimo e ter baixo consumo energético. Este trabalho investigou a aplicação de bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, na forma isolada ou consorciada, em processos de biorremediação e sua possibilidade em reduzir teores de nitrato, fosfato, sulfato e/ou nitrogênio total em percolados parcialmente tratados de aterros sanitários. O efluente foi precipitado com tanino, teve seu pH corrigido para 7,5, após a autoclavagem e suplementação com fonte de carbono, recebeu a denominação de efluente tratado. Uma amostra do efluente tratado foi enviada para análise em laboratório quanto a sua composição química antes da inoculação. As linhagens bacterianas foram cultivadas e caracterizadas em laboratório e após seu crescimento foram inoculadas no efluente tratado, que recebeu a denominação de efluente preparado. A inoculação foi feita em frascos de 250 mL e a incubação em incubadora de agitação orbital tipo *shaker*, a 32° C, 60 ciclos/min, durante 32 dias. Durante o período de incubação foram coletadas amostras dos frascos e plaqueadas, com o objetivo de se verificar o comportamento microbiano e estabelecer assim a curva de crescimento bacteriano. No final período foram coletadas alíquotas e enviadas para análise laboratorial quanto aos parâmetros proposto no experimento. Foi possível observar o crescimento e contagem das colônias e a mudança dos parâmetros avaliados, entre eles a redução dos níveis de sulfato e nitrato do efluente, demonstrando possibilidades futuras de aplicação em bioprocessos de remediação.

**Palavras chave:** Bactérias redutoras. Biorremediação. Bioprocessos.

## ABSTRACT

The accelerated advance of industrialization and urbanization in Brazil in recent decades has generated an increasing production of municipal and industrial solid waste and effluents and sludge from such processes. The confinement of urban solid waste in landfills produces leachate with high toxicity due to high content of organic matter, heavy metals, nitrates and sulfates. The treatment of leachate is required before disposal to avoid impacts on watersheds. The bioprocesses are used since the beginning of the century in the treatment of domestic and industrial effluents with high organic load, requiring only the adjustment of some parameters such as pH and temperature, since these are important variables in the process of biotreatment. Bioremediation is alternative techniques that is characterized by natural, because it implies a minimum investment and have low power consumption. This study investigated the application of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*, in isolation or consortium in bioremediation processes and their ability to reduce levels of nitrate, phosphate, sulfate and / or total nitrogen in partially treated leachate from landfills. The effluent was precipitated with tannin, had its pH adjusted to 7.5 after autoclaving and supplemental carbon source, was named the treated effluent. A sample of the treated effluent was sent for laboratory analysis as to their chemical composition before inoculation. The bacterial strains were grown and characterized in the laboratory and after growth were inoculated in the treated effluent, which was called effluent prepared. The inoculation was made in bottles of 250 ml and incubated in shaking incubator type orbital shaker at 32° C, 60 cycles / min for 32 days. During the incubation period samples were collected from the flasks and plated, with the aim of studying microbial behavior and thus establish the curve of bacterial growth. In the final period aliquots were collected and sent for laboratory analysis parameters to those proposed in the experiment. It was possible to observe the growth and enumeration of colonies and the change of the parameters evaluated, including the reduction of sulfate and nitrate levels in the effluent, showing future possibilities of application in bioprocesses remediation.

**Keywords** :Reducing bacteria. Bioremediation.Bioprocess.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista aérea do aterro Sanitário Guajuviras .....	39
Figura 2 - Operação de retirada do Percolado da Lagoa nº5 .....	41
Figura 3 - Efluente Tratado, Laboratório de Microbiologia – Unilasalle .....	48
Figura 4 - Incubadora Orbital Shaker KS 4000i control IKS com Efluente Preparado.....	49
Figura 5 - Placas de Petri com crescimento bacteriano em diferentes concentrações .....	50
Figura 6A – Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em placas de Petri, na concentração $10^4$ .....	53
Figura 6B – Crescimento do consórcio, em Placas de Petri, na concentração $10^4$ ...	53
Figura 6C – Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em placas de Petri, na concentração $10^6$ .....	53
Figura 6D – Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em Placas de Petri, na concentração $10^3$ . .....	53
Figura 7 - Determinação da curva de Crescimento Bacteriano através da contagem em placas de unidade formadora de colônia por mililitro (UFC.mL <sup>-1</sup> ) das Linhagens Bacterianas Testadas .....	54
Figura 8 - Variações do DBO <sub>5</sub> e DQO decorrente da atividade dos microrganismos durante o experimento .....	58
Figura 9 - Variação do teor de Fósforo .....	60
Figura 10 - Variação do teor de Nitrato.....	62
Figura 11 - Variação do teor de Nitrogênio Amoniacal.....	63
Figura 12 - Variação do teor de Nitrogênio Total .....	64
Figura 13 - Variação do teor de Sulfato.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Íons presentes no chorume de aterros sanitários e possíveis fontes .....	14
Tabela 2 - Valores da DBO em diferentes tipos de águas residuárias.....	29
Tabela 3 - Mudanças dos valores de concentração de parâmetros de caracterização do chorume com a idade dos aterros sanitários.....	38
Tabela 4 - Valores de pH, temperatura e potencial redox verificados no percolado gerado pelo aterro sanitário, no momento da amostragem.....	52
Tabela 5 - Valores dos Parâmetros Físico-Químicos: pH, Eh, OD, DBO <sub>5</sub> , DQO e Proteínas Totais.....	57
Tabela 6 - Determinação dos parâmetros físico-químicos do efluente nos Tempos T <sub>inicial</sub> e T <sub>final</sub> para os diferentes Microrganismos e seu consorcio .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

APHA - American Public Health Association

B<sub>1</sub> – *Bacillus cereus*

BHI – Caldo de Infusão de Cérebro e Coração

BRN – Bactérias Redutoras de Nitrato

BRN-OS – Bactérias Redutoras de Nitrato e Sulfato

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

NBR - Norma Brasileira

OD – Oxigênio Dissolvido

P<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa*

P<sub>1</sub>/B<sub>1</sub> - *Pseudomonas aeruginosa*/ *Bacillus cereus* (consórcio)

PCA – Ágar Plate Count

PEAD – Polietileno de Alta Densidade

PVC - Policloreto de Vinila

RSU – Resíduos Sólidos Urbanos

SMMA – Secretaria Municipal do Meio Ambiente

SSP – Solução Salina Peptonada

UFC – Unidade Formadora de Colônias

T – Tempos de análises

T<sub>0</sub> – Tempo Inicial

T<sub>3</sub> – Tempo Final

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Bactérias</b> .....	16
2.1.1	<i>Metabolismo Bacteriano</i> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Biorremediação</b> .....	19
2.2.1	<i>Microrganismos envolvidos na Biorremediação</i> .....	19
2.2.2	<i>Mecanismo energético da Biorremediação</i> .....	20
2.2.3	<i>Aplicação da Biorremediação</i> .....	20
2.2.3.1	<i>Ação das bactérias na remoção de metais pesados de efluentes</i> .....	22
2.2.3.2	<i>Biossorção</i> .....	22
2.2.3.3	<i>Bioacumulação e Biolixiviação</i> .....	23
2.2.4	<i>Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)</i> .....	24
2.2.5	<i>Bactérias Redutoras de Nitratos (BRN)</i> .....	25
2.2.6	<i>Oxidação Biológica do Sulfeto por Ação das BRN-OS</i> .....	26
2.2.7	<i>Bactérias Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
2.2.8	<i>Bactérias Bacillus Cereus</i> .....	27
<b>2.3</b>	<b>Aterros Sanitários</b> .....	28
2.3.1	<i>Ecossistema Aterro Sanitário</i> .....	28
2.3.1.1	<i>Atividades dos Microrganismos em Aterros Sanitários</i> .....	28
2.3.2	<i>Fases da decomposição Anaeróbia</i> .....	29
2.3.3	<i>Vantagens da decomposição Anaeróbia</i> .....	31
2.3.4	<i>Estabilidade em Sistemas Anaeróbios e Toxicidade</i> .....	32
2.3.4.1	<i>Potencial Hidrogenônico (pH)</i> .....	32
2.3.4.2	<i>Oxigênio Dissolvido (OD)</i> .....	33
2.3.4.3	<i>Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)</i> .....	33
2.3.4.4	<i>Inibição das BRS pelo aumento do potencial Redox (Eh) do Meio</i> .....	34
2.3.4.5	<i>Ácidos Graxos Voláteis (AGV) e Alcalinidade</i> .....	35
2.3.4.6	<i>Fósforo</i> .....	36
2.3.4.7	<i>Nitrato, Nitrogênio Orgânico e Nitrogênio Amoniacal</i> .....	36
2.3.4.8	<i>Sulfato, Sulfetos e Metais Pesados</i> .....	37
<b>2.4</b>	<b>Biodegradabilidade</b> .....	38

<b>3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO</b> .....	40
<b>3.1</b>	<b>Histórico do Aterro</b> .....	40
<b>3.2</b>	<b>Geração e Tratamento dos Percolados</b> .....	41
<b>3.3</b>	<b>Reciclagem de Materiais</b> .....	42
3.3.1	<i>Coleta Seletiva</i> .....	42
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	44
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	44
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	45
<b>5.1</b>	<b>Coleta e Preparação das Amostras</b> .....	45
<b>5.2</b>	<b>Tratamento parcial do efluente</b> .....	45
<b>5.3</b>	<b>Taninos</b> .....	46
<b>5.4</b>	<b>Análises Físico-químicas</b> .....	47
5.4.1	<i>Nitratos e Sulfatos</i> .....	47
5.4.2	<i>Medidas de pH, Eh, DQO, DBO<sub>5</sub> e OD</i> .....	47
<b>5.5</b>	<b>Microrganismos</b> .....	47
5.5.1	<i>Seleção e Preparação do Pré-inóculo</i> .....	48
5.5.2	<i>Inoculação dos Microrganismos e Formação dos Consórcios</i> .....	48
5.5.3	<i>Determinação da curva de crescimento Bacteriano</i> .....	50
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>6.1</b>	<b>Temperatura e pH</b> .....	53
<b>6.2</b>	<b>Contagem das Bactérias</b> .....	53
<b>6.3</b>	<b>Fases de crescimento Bacteriano</b> .....	54
6.3.1	<i>Curva de crescimento Bacteriano</i> .....	55
<b>6.4</b>	<b>Ensaio Físico-Químico</b> .....	57
<b>6.5</b>	<b>Análise da Concentração dos Parâmetros Fósforo Total, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal, Nitrogênio Total e Sulfato No Efluente</b> .....	59
6.5.1	<i>Fósforo Total</i> .....	60
6.5.2	<i>Nitrato</i> .....	61
6.5.3	<i>Nitrogênio Amoniacal</i> .....	63
6.5.4	<i>Nitrogênio Total</i> .....	64
6.5.5	<i>Sulfato</i> .....	65
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>7.1</b>	<b>Sugestões para estudos futuros</b> .....	69

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
<b>ANEXO A - MEIOS DE CULTURA e REAGENTES</b> .....	81

## 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, a geração e disposição de resíduos sólidos urbanos e industriais adquiriram formas e dimensões que se aproximam de situações catastróficas, sobretudo nos grandes centros urbanos e ecossistemas ambientalmente sensíveis, tais como os litorâneos, representando uma problemática permanente aos gestores públicos e privados envolvidos no seu gerenciamento (SISSINO, 2000; GRANZIERA, 2001).

Nas duas últimas décadas, o avanço desenfreado da urbanização e industrialização no Brasil determinou o aumento da geração e descarte de resíduos sólidos, lodos e efluentes derivados de tais processos, trazendo como consequência a poluição dos solos, mananciais hídricos superficiais e subterrâneos. Apesar do avanço decorrente da Lei nº9. 433 - Política de Recursos Hídricos Brasileira, que versa sobre a cobrança pelo uso dos corpos d'água para o lançamento de efluentes, a situação não se normalizou. Não raro os veículos de comunicação publicam notícias sobre desastres ecológicos, decorrentes do descumprimento da Legislação.

No Brasil, conforme Vailati (1998), a denominação de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU) se aplica aquele lixo cuja coleta, transporte e destinação final são, legalmente de responsabilidade das prefeituras municipais, incluindo os resíduos domiciliares, comercial e o público.

O lixo domiciliar é formado pelos resíduos sólidos gerados nas atividades diárias de residências. Este resíduo apresenta um alto teor de matéria orgânica, variando de 55% a 67% no Brasil, além de outros componentes reaproveitáveis como plásticos, vidros, latas, etc. (PEREIRA NETO, 2007).

Os aterros sanitários consistem na disposição e confinamento dos resíduos no solo, observando critérios de engenharia e normas operacionais específicas; o aprimoramento dessa técnica é necessário para controle de poluição ambiental e proteção da saúde pública (NBR 8419/92).

As atividades dos aterros sanitários geram percolados extremamente tóxicos, com valores altos para Demanda Bioquímica e Demanda Química de Oxigênio (DBO e DQO), além de teores elevados de metais pesados e sólidos suspensos. A tabela 1 mostra os principais íons presente nos percolados, bem como possíveis de sua fonte de origem. Os elevados teores de nitrogênio amoniacal, que em virtude de seu potencial eutrofizante, determinam riscos à saúde humana, decorrentes da sua

conversão a nitrato/nitrito, necessitam tratamento antes do descarte, prevenindo assim contaminações em mananciais hídricos superficiais e subterrâneos, evitando prejuízos à fauna e flora aquática. (BAIRD, 2002; BIDONE, 2001)

Tabela 1 – Íons presentes no chorume de aterros sanitários e possíveis fontes

<b>Tipo de Íon presente</b>	<b>Composição do material depositado</b>
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ,	Material orgânico, entulho de construção e casca de ovos; Material orgânico;
Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup> Hg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	Material eletrônico e tampas de garrafas; Pilhas comuns e alcalinas, lâmpadas fluorescentes;
Ni <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup>	Baterias recarregáveis (celulares telefones sem fio e automóveis);
Al <sup>3+</sup>	Latas descartáveis, utensílios domésticos e embalagens laminadas em geral;
Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , Ag <sup>+</sup> As <sup>3+</sup> , Sb <sup>3+</sup> , Cr <sup>x+</sup>	Tubos de PVC, negativos de filmes e Raios X; Embalagens com resto de tintas, vernizes e solventes orgânicos.

Fonte: IPT/CEMPRE, 2000.

Trabalhos realizados na área de tratamento de efluentes apontam o uso de microrganismos nos mais variados ramos da atividade industrial: indústria de alimentos, petróleo, mineração, no tratamento de efluentes e acidentes potencialmente capazes de impactarem solos e corpos hídricos.

A utilização de microrganismos no tratamento de despejos industriais e municipais, com altos teores de matéria orgânica, data do início do século; porém sua eficiência não decorre apenas da capacidade metabólica dos microrganismos, mas também da necessidade de ajustes de parâmetros como o pH e temperatura, considerando-se que são variáveis importantes nessa metodologia. A biorremediação representa uma técnica promissora em razão de sua simplicidade e baixo custo, quando comparados aos métodos convencionais (ALEXANDER, 1994).

Neste contexto, surge a necessidade da aplicação de tecnologias alternativas para o tratamento de efluentes, que atendam as atuais demandas e sejam mais eficientes e limpas que os métodos convencionais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica elenca os elementos teóricos para o entendimento desse estudo. Inicialmente foram abordados conceitos sobre microrganismos, demonstrando a sua importância e os principais mecanismos utilizados por eles no processo de biorremediação. Posteriormente, discutiu-se a problemática dos aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos, a toxicidade dos percolados gerados pelas suas atividades, bem como o emprego de microrganismos no processo de biorremediação, atenuando os impactos produzidos pelo gerenciamento do aterro.

### 2.1 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares, microscópicos, procariontes, que não possuem núcleo e nem organelas. Elas podem ser encontradas na forma isolada ou em colônias. Podem viver na presença do oxigênio (aeróbia) ou na ausência do mesmo (anaeróbia) ou ainda ter ambas as habilidades, (facultativas). São Organismos muito antigos, datando de 3,8 milhões de anos (OLIVEIRA, 2006).

As bactérias foram descobertas em 1683 por Antoni Van Leeuwenhoek, a denominação bactéria foi dada por Ehrenberg em 1828 pelo seu tamanho; somente no século XIX despertaram interesse de cientistas como Robert Koch e Louis Pasteur. Quanto à classificação elas foram classificadas entre as plantas por Lineu; em 1866 incluída no Reino Protista por Ernst Haeckel; em 1969 houve a sua inclusão colocada entre os procariontes no reino Monera por Whittaker e finalmente Carl Woese dividiu os procariontes em Bactéria e Archea.

De acordo com a fonte de átomos de carbono para a produção de suas moléculas orgânicas, as bactérias são classificadas como: autotrófica e heterotróficas. Os termos autotróficos e heterotróficos são utilizados para designarem a natureza da principal fonte de carbono para a biossíntese das bactérias: as categorias de bactérias que obtêm carbono para sua síntese a partir do  $\text{CO}_2$  e aquelas que obtêm carbono para sua biossíntese a partir de compostos orgânicos, respectivamente. Há organismos que utilizam a luz como fonte energia, empregando o carbono inorgânico como fonte de carbono (fotolitotróficos) e os fotoorganotróficos, que também utilizam a energia luminosa, porém são incapazes

de sintetizar o  $\text{CO}_2$ . Quando as bactérias empregam a energia química como fonte de energia, são classificadas como: quimiolitotróficas e quimiorganotróficas, quando os doadores de elétrons são substâncias inorgânicas e orgânicas, respectivamente (Shippers, 2007).

### *2.1.1 Metabolismo Bacteriano*

As bactérias utilizam o material orgânico para a produção de suas células e, também como fonte de energia (BITTON, 2001).

O Metabolismo é o conjunto de reações bioquímicas que ocorre em uma célula; é catalisado por enzimas, que aceleram as reações. Através do metabolismo as bactérias realizam dois processos: anabolismo e catabolismo. No anabolismo ocorre a transformação do material orgânico em massa celular. Não é um processo espontâneo, portanto necessita energia sob a forma de ATP para que a bactéria realize a síntese proteica (BROCK & MADIGAN, 1991). No catabolismo as bactérias realizam o conjunto de todas as reações de degradação de compostos orgânicos destinados à obtenção de energia. As reações catabólicas liberam energia pela quebra de moléculas complexas e mais energéticas, em moléculas mais simples que podem ser reutilizadas como blocos básicos de construção, fornecendo energia para os processos vitais (TORTORA, 2000).

Van Haandel, 2006 distingue dois tipos de catabolismo celular: o processo oxidativo e o fermentativo. No primeiro o material orgânico é oxidado por um oxidante extracelular presente no efluente (oxigênio, nitrato e sulfato), gerando compostos inorgânicos estáveis como  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (VON SPERLING, 2002). No catabolismo fermentativo o composto catabolizado é decomposto em substâncias mais simples.

Os nutrientes necessários para as diversas funções celulares dos microrganismos são macromoléculas, complexas e com alto peso molecular, portanto necessitam ser hidrolisada extracelularmente para terem uma difusão facilitada através da membrana celular, a quebra desses blocos maiores é realizada pela atividade enzimática. Há nutrientes que para serem absorvidos necessita transporte ativo, energia na forma de ATP (BITTON, 2002).

A maior parcela do nitrogênio contido nos alimentos se encontra formando parte das proteínas e, esta para serem usadas como fonte de nitrogênio pelos

microrganismos deverá ser quebrada pelo ataque enzimático, transformando-se em substâncias mais simples como peptídeos e aminoácidos.

As proteínas não atravessam a membrana celular dos microrganismos, que para utilizá-las secretam enzimas que as hidrolisam a peptídeos e aminoácidos; as enzimas podem estar presentes intra ou extracelularmente; as extracelulares atuam sobre os nutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos, favorecendo a digestão. As enzimas localizadas na membrana citoplasmática estão relacionadas com o transporte de substâncias para dentro e para fora da célula, com atividade respiratória e com estruturação da parede celular (BAZIN & PROSSER, 1998; NEIDHART, 1990; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Enzimas são biocatalisadores de reações químicas envolvendo reações de substratos orgânicos e inorgânicos. Proteases são enzimas capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias proteicas; estão associadas a importantes processos biológicos tais como: a digestão proteica, coagulação sanguínea e morte celular. As enzimas proteolíticas possuem vasta aplicação comercial e industrial.

As proteases bacterianas encontram inúmeras aplicações nas industriais de alimentos e indústria química. Espécies do gênero *Bacillus* possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas, que são amplamente utilizadas nas industriais e possuem alta atividade catalítica (JOO & CHANG, 2005).

Há evidência que uma bactéria seja uma proteolítica, uma vez que os meios em que ele é ensaiado passam a apresentarem valores de pH alcalinos, decorrentes do consumo de proteínas (ROMERO *et al.* 2001; SILVA, 2001).

A concentração de enzimas produzidas também é consequência da biomassa presente (BEG *et al.* 2002). Porém as condições que favorecem o crescimento celular (abundância de nutrientes) são opostas as condições que ativam a esporulação e, por consequência, a síntese da protease.

As bacteriocinas são compostos proteicos produzidos pelas bactérias com efeito inibidor entre espécies relacionadas. Nas Gram positivas são mais abundantes e diversas que as produzidas pelas Gram negativas (TAGG *et al.* 1976; JACK *et al.* 1995).

As bacteriocinas produzidas pelas Gram positivas não são letais como o caso das Gram negativas. Quando há liberação da Bacteriocinas ocorre um efeito lítico sobre a membrana celular ocasionado a lise celular. A diferença é explicada a partir de um mecanismo de transporte específico de que as Gram positiva estão

aparelhadas (JACK *et al.* 1995).

## 2.2 Biorremediação

É crescente a aplicação da biotecnologia nos diversos setores industriais, utilizando organismos vivos com o objetivo de produzir ou modificar produtos (ALBAGLI, 1998).

A biorremediação ou atenuação natural é um processo que envolve as reações químicas promovidas pelos microrganismos, baseia-se na capacidade de microrganismos selvagens em degradar contaminantes em geral, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (BORDEN *et al.* 1995).

A técnica da biorremediação representa uma importante alternativa na área da pesquisa, com vantagens por ser um processo natural, com baixo consumo de energia; não oferecer riscos ecológicos demasiados em comparação com os métodos convencionais normalmente utilizados e possuir menor custo-benefício em relação a outros processos que, além de onerosos são ineficientes. Pode ser *in situ*, quando os microrganismos são utilizados no próprio local (autóctones); ou ainda com adição de agentes estimulantes como: nutrientes, oxigênio e biosurfactantes (bioestimulação) e finalmente com a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaugmentação) (BENTO *et al.* 2003).

### 2.2.1 Microrganismos envolvidos na Biorremediação

As bactérias são consideradas excelentes microrganismos biorremediadores, porque toleram condições extremas, possuindo resistência aos metais tóxicos. Utilizam substratos orgânicos e inorgânicos como fonte de nutrição, com a formação de CH<sub>4</sub> e compostos inorgânicos como NH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> (Dantas *et al.* 2002). A extraordinária plasticidade nutricional capazes de mudar seu conjunto de enzimas para sobreviverem, a exploração de condições aeróbias e anaeróbias, litotróficas ou organotróficas, são exemplos dos mecanismos bioquímicos utilizados pelas bactérias na biorremediação.

### 2.2.2 Mecanismo energético da Biorremediação

Um composto orgânico, em geral é oxidado doando elétrons para umceptor final de elétrons ou reduzido ganhando elétrons. Na ausência de oxigênio ( $O_2$ ), outros oxidantes alternativos como nitrato ( $NO_3^-$ ) e sulfato ( $SO_4^-$ ) podem ser utilizados como elétrons aceptores.

Conforme Mazzuco (2004) na presença de múltiplos aceptores de elétrons, os microrganismos tendem a utilizar aquele que for mais favorável, tendo como ordem de preferência  $O_2 > NO_3^- > MnO_2 > Fe(OH)_3 > (SO_4^{2-}) > CO_2$  (LOVLEY *et al.*1994).

O tipo e a concentração dos compostos passíveis de serem reduzidos são importantes fatores na determinação do curso da redução; como as reações de oxi-redução acompanham uma sequencia termodinâmica relacionada à facilidade em receber elétrons, um composto de menor afinidade será reduzido apenas depois que a concentração de compostos de maior afinidade for baixa. Desta forma, ocorrerá redução de quantidades significativas de manganês, por exemplo, apenas depois que o nitrato for reduzido quase totalmente e assim sucessivamente. Porém na prática é possível que algum óxido de ferro, por exemplo, tenha mais afinidade por elétrons do que o óxido de manganês em determinada fase e venha a ser reduzido primeiramente, porque a sequencia termodinâmica foi desenvolvida para sistemas puros.

### 2.2.3 Aplicação da Biorremediação

Nas últimas décadas cresceu o interesse e a produção por biossurfactantes, em razão de suas inúmeras propriedades como: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, redução de viscosidade e redução da tensão superficial, que possibilitam sua aplicação na indústria de cosméticos, farmacêutica, higiene e limpeza, indústria do petróleo, recuperação de petróleo, biorremediação e dispersão no derramamento de óleos; na indústria de alimentos pela sua baixa toxicidade; também devido ao custo e cuidados ambientais que eles propiciam.

Os biossurfactantes são compostos oriundos da atividade metabólica das bactérias capazes de sintetizarem substâncias com propriedades tensoativas, são utilizados na indústria em geral. As propriedades surfactantes (redução de tensão superficial e alta capacidade emulsificante) fazem com que seu uso seja

recomendado na substituição de surfactantes sintéticos (MESQUITA, 2004; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

A estrutura dos biossurfactantes são moléculas anfipáticas, constituída por uma porção hidrofílica composta por aminoácidos ou peptídeos e a porção hidrofóbica formada por hidrocarbonetos saturados ou insaturados ou ácidos graxos hidroxilados (GEORGIU *et al.* 1992; MULLIGAN *et al.* 2001).

A sua aplicação principal na indústria do petróleo, esta relacionada ao aumento da solubilidade dos componentes do petróleo (LIMA, 1996; KIM *et al.* 2000; HARVEY *et al.* 1990; ROBERT *et al.* 1991).

O uso dos biossurfactantes é vantajoso em relação aos surfactantes sintéticos, porque possuem alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, podendo ser produzido *in situ* ou *extra situ* (PERFUMO *et al.* 2006; MULLIGAN, 2005; MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; CARRILLO *et al.* 1996).

Os biossurfactantes apresentam habilidades como a redução de tensões superficiais, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas e hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e consequente biodegradabilidade (ANNA, 2000; BARATHI, 2001; BOGNOLO, 1999).

Na área ambiental o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* esta sendo utilizada na fabricação de biossurfactantes, que são aplicados a acidentes com vazamento de hidrocarbonetos (HARVEY *et al.* 1990; ROBERT *et al.* 1991). Os biossurfactantes da classe raminolipídios produzidos pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, foram utilizados no acidente do “Exxon Valdez” no Alaska.

Normalmente a produção dos biossurfactantes é dependente da assimilação de hidrocarbonetos pelos microrganismos, portanto está vinculada a atividade de microrganismos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos. Porém há relatos de biossurfactantes produzidos a partir da glicose, sacarose, glicerol e etanol (PALEJWALA e DESAI, 1989; HOMMEL e HUSE, 1993). Como exemplo tem a surfactina, que é uma substância biosurfactante produzida pelo *Bacillus*, no entanto a fonte de carbono é um carboidrato e não um hidrocarbonetos ou óleo.

### 2.2.3.1 Ação das bactérias na remoção de metais pesados de efluentes

A remoção de metais pesados de efluentes é decorrente da propriedade que as bactérias possuem de afetar a especiação desses metais, em razão de sua capacidade ativa ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização, que influenciam o equilíbrio das espécies metálicas entre as fases líquida e sólida (GADD, 2004).

Quando ocorre a redução de um metal para um estado de oxidação menor, a mobilidade e a toxicidade, também podem ser reduzidas. Esta propriedade facilita o uso desta técnica na biorremediação. A mudança do estado de oxidação proporciona caminhos alternativos à biorremediação: redução da solubilidade com precipitação do metal, tornando-o indisponível aos organismos; ou o aumento da solubilidade facilitando a sua remoção (LEE *et al.* 2008; CHEUNG e GU, 2007; KRISHNA e PHILLIP, 2005).

O mecanismo bioquímico microbiano não consiste na degradação do átomo contaminante, mas na mudança do estado de oxidação do metal, permitindo a sua detoxificação (SPROCATTI *et al.* 2006).

De acordo com Sing e Cameotra (2004) no processo de biorremediação os microrganismos atuam alterando a especiação dos contaminantes e depurando-os em formas não tóxicas ou menos tóxicas. As reações bioquímicas atuam no sentido de concentrar o contaminante, precipitando no local ou transformando em substâncias voláteis capazes de serem removidas.

### 2.2.3.2 Biossorção

A biossorção é definida como a ação através da qual os microrganismos adsorvem espécies metálicas, valendo-se de recursos físico-químicos existentes na superfície celular. A entrada de metais no interior de células microbianas esta associada à difusão e gradientes osmóticos (forma passiva) e a outra forma envolve gasto energético ATP, transporte ativo (NIES; SILVER, 1995).

Nas células vivas, a atividade metabólica também pode influenciar esse processo em razão da mudança de pH, Eh, nutrientes orgânicos e inorgânicos e dos metabólitos produzidos. Independente da sorção que acontece nas superfícies celulares, algumas espécies catiônicas podem ser acumuladas dentro das células,

via transporte de membrana. Uma vez dentro das células as espécies metálicas podem ser ligadas, precipitadas, e localizadas dentro de estruturas ou organelas celulares, dependendo do elemento e do microrganismo (ECCLES, 1995; GADD, 2004).

Conforme Gadd, 1992a, na biossorção a acumulação de metais pesados, por mecanismos independentes do metabolismo celular, se dá por interações físico-químicas entre o metal e os constituintes da parede celular e outros materiais associados à face externa da membrana celular. A independência do metabolismo ocorre pelo fato de não ser necessário um gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. A remoção, neste caso pode ocorrer usando tanto células vivas como mortas.

### 2.2.3.3 Bioacumulação e Biolixiviação

A bioacumulação é o transporte dos cátions de metais pesados, através da membrana celular e, sua acumulação intracelular é dependente do metabolismo, ou seja, ocorrem somente em células vivas, capazes de gerar energia. A remoção de íons metálicos pelo mecanismo de bioacumulação é mais lento do que a biossorção físico-química, porém pode acumular quantidades maiores de metal (GADD, 1988).

Para Watling (2006), a biotecnologia vem sendo amplamente utilizada no bioprocessamento mineral. Conforme o autor, no bioprocessamento tem: **a)** a biolixiviação, solubilização de metais por microrganismos quimiotróficos, que suprem suas necessidades energéticas oxidando compostos orgânicos e inorgânicos, para a manutenção de seu metabolismo; **b)** biobeneficiamento, o emprego de microrganismos associados à flotação e floculação, atuando na remoção seletiva de minerais contidos num determinado minério.

De acordo com Grundwel (2003) a biolixiviação compreende uma série de reações químicas e bioquímicas mediadas pelos microrganismos, podendo ser utilizada na extração de metais em minério com baixo teor, com a solubilização de metais. A solubilização de superfícies sólidas tem dividido a opinião dos pesquisadores; uma corrente defende que os mecanismos de solubilização direta e indireta ocorrem simultaneamente em um sistema de lixiviação; ressaltam que no mecanismo direto as bactérias, aderidas à superfície do mineral realizariam sua dissolução por meio de reações envolvendo suas enzimas (mecanismo biológico

específico na degradação do substrato) e, por isso, ganharia energia direta do mineral. No mecanismo indireto os íons férricos em solução é que dissolveriam (solubilizariam) o mineral do minério; as bactérias ganhariam sua energia a partir da regeneração dos íons férricos.

A ação das bactérias na bioflotação e biofloculação decorre da presença de grupos funcionais ionizáveis existentes na superfície dos microrganismos, capazes de substituir a função de reagentes químicos convencionais utilizados na flotação e floculação, no processamento mineral. Os microrganismos, através de suas enzimas ou produtos metabólitos, são capazes de modificar a superfície mineral, de forma direta ou indiretamente. No mecanismo direto, as células microbianas envolvem as partículas minerais; já no mecanismo indireto, os produtos do metabolismo ou frações solúveis da célula funcionam como reagentes ativos na superfície (SMITH e MISHA, 1993).

#### *2.2.4 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)*

As bactérias redutoras de sulfato são Gram negativas, mesófilas, com capacidade de degradar anaerobicamente a matéria orgânica, promovendo assim a redução de sulfato a sulfeto. As BRS estão amplamente distribuídas em ambientes terrestres e aquáticos, apresentam crescimento satisfatório numa faixa ampla de pH entre 5,0 e 9,0 com pH ótimo variando entre 7,2 e 7,8; sendo que valores de pH na faixa 6,8 a 8,5 permite que as BRS tolerem maiores concentrações de sulfeto (TANG, BASKARAN & NEMAT, 2009).

As BRS estão divididas em dois grandes grupos: o primeiro usa lactato, piruvato, etanol e determinados ácidos graxos como doadores de elétrons, sendo o produto final a oxidação do acetato; o segundo grupo oxida ácidos graxos, particularmente acetato, na redução do sulfato a sulfeto. A principal diferença entre os dois grupos é que o segundo possui a capacidade oxidar completamente ácidos graxos, lactatos succinato e benzoato até  $\text{CO}_2$  (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A redução do sulfato é um dos principais eventos observados, sempre que condições redutoras se estabelecem. As BRS são capazes de utilizar o sulfato como acceptor final de elétrons na respiração anaeróbia, processo chamado de redução desassimilativa do íon sulfato, na qual esse íon atua como agente oxidante para a

metabolização da matéria orgânica (GONZÁLEZ *et al.* 1998). A diferença entre a redução assimilativa e desassimilativa do íon sulfato, reside no fato que, na primeira o sulfato é incorporado como fonte de enxofre para os processos de biossíntese, no entanto, na redução desassimilativa do sulfato, restrita as BRS, o íon é utilizado como acceptor final de elétrons para a geração de energia, em consequência tem-se a excreção do H<sub>2</sub>S.

Conforme Brock *et al.* (1995), existe uma variedade de microrganismos capazes de utilizar sulfato como fonte de enxofre pela assimilação de sulfato. Em ambientes anaeróbicos e em condições redutoras, contendo elevadas concentrações de sulfato, as BRS promovem a sua conversão em sulfeto, num processo denominado de redução de sulfato. Este grupo de microrganismos é composto por bactérias heterotróficas anaeróbicas, entre as quais se incluem as *Pseudomonas* e *Bacillus* (WANG & BANKS, 2007; ZAGURY *et al.* 2006; STUBNER, 2004).

Existem também as bactérias redutoras de sulfato capazes de utilizar o nitrato como acceptor final de elétrons, o que favorece a redução da produção de sulfeto (HAVEMAN; GREENE; VOORDOUW, 2005; SUNDE, *et al.* 2004., ENERGY INSTITUTE, 2003; HUBERT *et al.* 2003; ECKFORD; FEDORAK, 2002a; MYHR, *et al.* 2002; DAVIDOVA, 2001).

O emprego das BRS também tem sido estudado para aplicação na biorremediação de solos, água subterrânea e outros ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, onde segundo pesquisas, essas bactérias conseguem ter atividades metabólicas na presença de compostos recalcitrantes e que prejudicam o meio ambiente (ALVAREZ & DA SILVA, 2004; BOOPATHY, 2003; KLEIKEMPER *et al.* 2002; KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001; LOVLEY *et al.* 1996).

#### 2.2.5 Bactérias Redutoras de Nitratos (BRN)

As bactérias redutoras de nitrato são microrganismos aeróbios facultativos. Na presença do oxigênio o microrganismo realiza a respiração aeróbia e na sua ausência passa a utilizar um acceptor final de elétrons alternativo, como o nitrato. (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

No processo de degradação da matéria orgânica, em condições anaeróbicas, é

utilizado um aceptor de elétrons inorgânico como  $\text{NO}_3^-$  (redução de nitrato). A presença de nitrato no sistema pode desencadear a competição entre as BRS e BRN quimiorganotróficas (quimioheterotróficas) por compostos orgânicos que servem como doadores de elétrons.

Segundo Gonzales *et al.*(1998) a presença de nitrato estimula o crescimento das BRN, por ser seu metabolismo energeticamente mais favorável comparado ao consumo de sulfato pelas BRS e, porque estando em maior concentração elas podem competir mais intensamente por fontes de carbono e nutrientes, dificultando o crescimento das BRS. Por sua vez a atividade mais intensa das BRN resulta na redução de suprimentos de ácidos orgânicos, impedindo o desenvolvimento das BRS; a aplicação de nitrato ao sistema assegura uma maior atividade de bactérias redutoras de nitrato, uma vez que a redução química do nitrato permite aos microrganismos um ganho energético consideravelmente maior que a redução de sulfato.

Há referências de trabalhos realizados por diversos pesquisadores em recuperação e limpeza de reservatórios de óleos na Indústria de Petróleo, na área de recuperação de petróleo, acidificação e corrosão de reservatório de petróleo, onde foi utilizada a adição de nitrato em sistemas anaeróbicos de tratamento biológico de efluentes no sentido de aumentar a população de BRN e inibir o crescimento das BRS. Porém o processo de adição intermitente de nitrato para evitar a geração de sulfeto de hidrogênio, não é um mecanismo independente e está ligado a outros fatores, entre eles a relação BRS/BRN presente no efluente MAXWELL *et al.* (2003).

As BRN também podem realizar a redução assimilativa e desassimilativa do nitrato, em processo análogo ao que acontece com as BRS, em relação ao sulfato. Na redução assimilativa, o nitrato é convertido à amônia, posteriormente incorporado à célula como fonte de nitrogênio para crescimento celular, já na redução desassimilativa é utilizado como aceptor final de elétrons, sendo convertido a nitrogênio gasoso,  $\text{N}_2$  (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, ENERGY INSTITUTE, 2003).

#### 2.2.6 Oxidação Biológica do Sulfeto por Ação das BRN-OS

Conforme BØDTKER, *et al.* 2009, as espécies de bactérias redutoras de

nitrato capazes de oxidar o sulfeto (BRN-OS), elas são quimiolitotróficas, obtêm energia pela oxidação de compostos inorgânicos do enxofre reduzido e, sendo assim, possuem a capacidade de remover o sulfeto, aumentando o potencial redox e, conseqüentemente inibindo o crescimento das BRS. Nessa condição o nitrato serve como acceptor final de elétrons para a reoxidação de sulfeto a sulfato ou enxofre elementar.

Pode haver a atividade concomitante de espécies de BRN, que apresentam a capacidade simultânea de oxidação de sulfeto (BRN-OS), ocasionando a remoção de sulfeto e promovendo a elevação do potencial redox do sistema, o que resulta em condições impróprias para o crescimento das BRS (JENNEMAN E GERVETZ. 1999; HITZMANN *et al.* 1998; MAXWELL *et al.* 2003).

#### 2.2.7 Bactérias *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias Gram negativas; na área da saúde, frequentemente, tem sido citada na medicina como sendo um microrganismo patogênico oportunista, associado à infecção humana, que ataca organismos debilitados, estando presente em inúmeros casos de infecções hospitalares. Ênfase a extrema resistência que esses microrganismos apresentam em relação aos antibióticos e condições extremas de pH e temperatura (TRABULSI *et al.* 2008).

Em testes realizados por Ganguli *et al.* 1998 com *Pseudomonas aeruginosa*, estas demonstraram ser relativamente dominante nos ambientes poluídos, sugerindo também sua potencialidade na detoxificação do cromo em efluentes industriais ricos em nutrientes, fornecendo energia necessária para sua multiplicação e redução do cromo nestes locais.

#### 2.2.8 Bactérias *Bacillus Cereus*

Os *Bacillus cereus* estão amplamente distribuídos na natureza, são bactérias bastonetes Gram positivo, caracterizada pela formação de esporos; a temperatura de crescimento varia entre 4°C a 55°C; apresentam grandes colônias, irregulares, rugosas, brancas e de odor característico; é um anaeróbio facultativo. Com a temperatura ótima entre 25°C e os 37°C, podem ser isolados em uma grande diversidade de alimentos; os sintomas de intoxicações ligadas ao consumo de

alimentos contaminados são caracterizados por dores abdominais e diarreias. Na área ambiental é uma bactéria nitrato redutora. É um microrganismos anaeróbio facultativo, requerendo baixos valores de potencial redox, geralmente abaixo de -150 mV.

## **2.3 Aterros Sanitários**

O processo de tratamento e disposição de resíduos sólidos tem como objetivo a redução de seu potencial poluidor ou viabilizar uma etapa posterior de disposição ou armazenamento dos mesmos, com a redução de seu volume (BIDONE E POVINELLI; FERNADEZ-VIÑA, 2000).

Os conhecimentos acerca do emprego de microrganismos no tratamento de efluentes de aterros sanitários decorrem de experimentos em biorreatores, portanto são processos controlados e realizados em bateladas que, pela sua pequena escala, se torna difícil extrapolar a sistemas maiores e com a magnitude dos aterros sanitários (MONTEIRO *et al.* 2006).

### *2.3.1 Ecosystema Aterro Sanitário*

Os aspectos microbiológicos de um aterro sanitário estão intimamente relacionados com a fração orgânica de seus resíduos. No local se estabelece uma população de microrganismos, que utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono como fonte de energia (BITTON, 2001).

A atividade microbiológica eleva a temperatura no interior do aterro sanitário, atingindo 60-70°C. O processo de degradação dos RSU inicialmente se desenvolve em regime aeróbio, porém o aterramento dos resíduos acarreta o decréscimo de oxigênio e a ação se restringe as bactérias anaeróbias facultativas, iniciando a primeira fase da decomposição anaeróbia (SIMONETI, 2006; FORESTI *et al.*1999).

#### **2.3.1.1 Atividades dos Microrganismos em Aterros Sanitários**

Na decomposição anaeróbia há um consórcio de microrganismos, atuando interativamente na bioestabilização da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia; além de haver a produção de novas

células microbianas. As bases bioquímicas e as complexas relações simbióticas existentes entre os grupos bacterianos envolvidas nessa conversão, ainda são desconhecidas, mesmo porque envolvem interações de várias e distintas espécies microbianas. Conforme Roest *et al.* (2005), essa dificuldade deve-se a escassez de métodos para identificação microbiana e avaliação de sua atividade metabólica restritos, até a década de 90, às técnicas de isolamento e cultivo em laboratório.

### 2.3.2 Fases da decomposição Anaeróbia

Conforme Junqueira e Simões (2000), a degradação anaeróbica em aterros sanitários compreende cinco fases, *Aeróbia*: caracterizada pela presença de oxigênio, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos aeróbios como fungos e bactérias. Trata-se de uma fase inicial de ajuste dos microrganismos às novas condições; *Anaeróbia* – a fase ácida ocorre até dois meses após o aterramento dos resíduos e marca a brusca queda do pH, em decorrência da presença acentuada dos ácidos orgânicos e da pressão parcial do dióxido de carbono. *Acetogênese*: caracterizada pela atividade das bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, que convertem os produtos gerados pelas acidogênicas em acetato e *Homoacetogênicas*, precursora da energia para a produção de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono produtoras de hidrogênio, a partir de ácidos orgânicos de cadeia longa; *Metanogênicas*: dividida em fase instável, com até dois anos de aterramento e fase estável dez anos após o aterramento.

Por outro lado autores como Van Haandel (2006), dividem o processo da degradação anaeróbia em quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. A hidrólise é a primeira etapa da decomposição anaeróbia, onde ocorre a despolimerização de substâncias orgânicas mais complexas e mais energéticas, como proteínas, carboidratos, lipídeos, através da ação das bactérias, que excretam exoenzimas hidrolíticas, degradando compostos mais complexos à moléculas mais solúveis e de baixo peso molecular (oligômeros e monômeros). A despolimerização das macromoléculas é necessária, pois permite a passagem através da membrana celular dos microrganismos (MADIGAN *et al.* 2004).

A fase acidogênica é marcada pela queda brusca do pH, pela liberação do íon  $H_3O^+$ , decorrente da produção de ácidos. Os produtos dissolvidos pela fase anterior são absorvidos e metabolizados pelas bactérias acidogênicas fermentativas e

excretadas como substâncias mais simples, ácidos graxos voláteis (AGV), ácido láctico, ácido acético,  $\text{CO}_2$  e compostos inorgânicos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ); a concentração desses ácidos contribui para a alta da DBO, característica da fase acidogênica Tabela 2. Acredita-se que essas duas etapas da digestão anaeróbia sejam realizadas por um mesmo grupo bacteriano, apesar de seus produtos serem diferentes, já que a hidrólise isoladamente é incapaz de suprir todas as necessidades celulares (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994).

Os produtos excretados pelas bactérias acidogênicas irão produzir modificações drásticas no pH do meio e servirão de substrato para as bactérias acetogênicas, responsáveis pela produção do hidrogênio; e a homoacetogênicas responsáveis pelo consumo de hidrogênio.

Tabela 2 - Valores de DBO para diferentes tipos de águas residuárias

<b>Águas residuárias</b>	<b>DBO (mg/L)</b>
<b>Esgotos sanitários</b>	200-600
<b>Efluentes de alimentos – enlatados</b>	500-2000
<b>Efluentes de Cervejarias</b>	500-2000
<b>Efluente de processamento de óleo comestível</b>	15000-20000
<b>Efluente de destilaria de álcool (vinhaça)</b>	15000-20000
<b>Percolados de aterros sanitários</b>	15000-20000
<b>Efluentes de matadouros (sem recuperação de resíduos)</b>	30000
<b>Efluentes de laticínios (sem recuperação de soro de queijo)</b>	40000-48000

Fontes: Glazer, 1995 e Harper, 1974.

A acetogênese é a fase intermediária do processo, onde as populações bacterianas servem de ligação entre as fermentativas e as metanogênicas; se caracteriza pela atividade das bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio. Dois grupos de bactérias acetogênicas atuam nesse processo: o primeiro grupo produz ácido acético,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  a partir de ácidos graxos intermediários; o segundo grupo, denominado de bactérias homoacetogênicas, são produtoras de acetato a partir de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . (ARCHER e KIRSOP, 1990).

A fase metanogênica é um dos mais importantes estágios da decomposição anaeróbia, ocorre quando as bactérias metanogênicas completam as atividades das anaeróbias facultativas; o potencial redox se reduz aos menores valores em um aterro sanitário, durante a fase metanogênica (POHLAND *et al.* 1985).

As bactérias metanogênicas são estritamente anaeróbias e necessitam pH neutro (6,6 – 7,3). Os ácidos voláteis produzidos na fase acidogênica e outros materiais orgânicos, agora são convertidos a  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ . Com o valor do pH próximo

à neutralidade, poucos materiais inorgânicos serão solubilizados e, conseqüentemente, a condutividade elétrica do efluente (capacidade de conduzir a corrente elétrica) diminui e o meio se torna mais redutor em relação a fase acidogênica (POHLAND, 1985).

A separação em fases da decomposição anaeróbia facilita a compreensão do processo, embora na prática essa divisão não ocorra de forma linear, porque a medida que aportam novas cotas de resíduos nas células do aterro reinicia uma nova fase ou interrompe a anterior, tornando-a incompleta (POHLAND; HARPER 1986).

### 2.3.3 Vantagens da decomposição Anaeróbia

Conforme Chernicharo (1997) embora os processos anaeróbicos possam gerar menos energia que os aeróbios, eles têm a alternativa de preservação da biomassa (colônias de bactérias anaeróbias), sem que haja o fornecimento de nutrientes por vários meses, ou seja, a colônia de bactérias entra em um estágio de endogenia, sendo reativada a partir de novas cotas de nutrientes. Ao contrário dos processos aeróbios, onde são utilizados aeradores a base de energia elétrica e a falta dessa energia ou queima dos motores pode colapsar o sistema, com a conseqüente perda da biomassa.

Os testes realizados em bateladas têm duas grandes limitações: o fato de desprezar os efeitos da adaptação e não detectar os efeitos tóxicos crônicos. A competição por nutrientes estabelece uma situação de stress entre os microrganismos afetando o próprio metabolismo, talvez essa seja a razão do questionamento sobre os processos *in vitro*, com isolamento dos microrganismos e mantidos em condições nutritivas e ambientes ótimos; um ambiente artificial muito diferente daquelas condições encontradas no meio ambiente. Observa-se que em experimentos de laboratório ocorre uma intensa multiplicação e crescimento microbiano, uma verdadeira explosão populacional, que se mantém até que o substrato fornecido seja consumido e volte a ser o fator limitante (CINTRA, 2003; BARROS, 2004; ALCANTARA, 2007).

No entanto, é crescente a realização de experimentos em bateladas, em escala de laboratorial, para avaliar o potencial da biomassa na sorção de metais; pesquisas indicando a aplicação dos biorreagentes em sistemas de separação sólido/líquido,

como flotação e também em colunas de leitos fluidizados, demonstram que a transição da escala de bancada para industrial é importante e pode ser verificada em algumas patentes de sistemas de biossorção já existentes. A simulação de condições ambientais reais para o tratamento de efluentes tem dividido opiniões.

#### *2.3.4 Estabilidade em Sistemas Anaeróbios e Toxicidade*

Os aterros sanitários de resíduos sólidos operam como grandes reatores anaeróbios. As condições de estabilidade dos processos anaeróbios estão relacionadas, entre outros fatores, a existência de espécies químicas que produzem inibição, principalmente as bactérias metanogênicas, muito sensíveis. Em todos os sistemas biológicos de tratamento de efluentes, a remoção efetiva de poluentes depende não apenas do potencial metabólico dos microrganismos, mas também de condições ambientais apropriadas para tais atividades. Portanto é importante evitar o aporte nas células do aterro de resíduos com alta concentração de agentes que possam produzir efeitos adversos à estabilidade bioquímica dos aterros.

Os parâmetros mais importantes na degradação e posterior solubilização de resíduos sólidos são: pH, umidade, potencial redox, solventes orgânicos e condutividade elétrica, porque essas variáveis exercem um papel importante nos estágios principais da decomposição anaeróbia, sendo responsáveis pela produção de enzimas, que hidrolisam compostos de cadeias complexas, transformando-os em compostos moleculares de cadeias simples (CHAPELLE, 1994; BORDEN et al. 1995; CORSEUIL E ALVAREZ, 1996).

##### *2.3.4.1 Potencial Hidrogenônico (pH)*

O pH é um fator que apresenta grande influência no processo aeróbio/anaeróbio, influenciando a atividade das enzimas hidrolíticas e dos microrganismos de todo o consórcio anaeróbio, principalmente dos microrganismos que têm baixa taxa de crescimento, como as bactérias metanogênicas. O processo de digestão anaeróbia ocorre no intervalo de pH de 6 a 8,3, sendo que valores de pH fora do intervalo ótimo podem inibir o processo de degradação, levando a subestimação da biodegradabilidade (ANGELIDAKY et al. 2004). Neste caso é necessário, para o desenvolvimento bioprocessos de degradação, o ajuste do pH,

com adição de agentes que proporcionem tamponamento do sistema na faixa ótima de pH.

#### 2.3.4.2 Oxigênio Dissolvido (OD)

O oxigênio dissolvido na água é importante para a sobrevivência dos seres aquáticos aeróbios e para a decomposição biológica da matéria orgânica. Este parâmetro também é utilizado no controle do fornecimento de oxigênio para os processos aeróbios, minimizando desperdícios de energia. Caso todo o oxigênio tenha sido consumido, reações anaeróbicas se realizam, podendo gerar maus odores através da volatilização de gases provenientes da atividade de bactérias metanogênicas e redutoras. A origem pode ser natural pela dissolução do ar atmosférico e pela produção de organismos fotossintéticos ou antropogênica, pela introdução de aeração artificial. Em termos de água residuárias, é necessária uma concentração mínima de 1mg/L de oxigênio dissolvido nos reatores dos sistemas aeróbicos (AMARAL *et al.* 2008).

#### 2.3.4.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A Demanda química de oxigênio (DQO) é o parâmetro que determina a quantidade de oxigênio necessário para oxidar toda a matéria orgânica contida em uma amostra em referencia (JEFFERY, 1992).

A Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) mede a quantidade de oxigênio necessário para que os microrganismos realizem a bioestabilização da matéria orgânica. Neste experimento a DBO foi analisada num ensaio padrão de cinco dias de incubação ( $DBO_5$ ) a temperatura constante de 20 °C, simulando as condições do corpo hídrico.

A  $DBO_5$  é a diferença de concentração medida entre o oxigênio dissolvido no momento da coleta da amostra e após cinco dias, tempo em que a amostra fica incubada a temperatura de 20°C, sendo consumido o oxigênio para a respiração dos microrganismos.

A relação  $DBO_5/DQO$  é utilizada para indicar a concentração de matéria orgânica biodegradável presente no chorume (MONTEIRO, 2003). Aterros sanitários

em atividade, isto é, aqueles que permanecem recebendo novas cotas de matéria orgânica nas células, a relação  $DBO_5/DQO$  variam entre 0,5 e 0,8, enquanto que aterros mais antigos ou com atividades encerradas essa relação baixa para 0,07 a 0,08 (NASCIMENTO FILHO, 2002).

#### 2.3.4.4 Inibição das BRS pelo aumento do potencial Redox (Eh) do Meio

As BRS se desenvolvem em ambiente em que os valores de pH oscilem entre 5 a 9; o potencial redox deve situar-se abaixo de -100 mV, sendo essencial para o desenvolvimento das BRS, já que a redução desassimilativa do sulfato é inibida em altos valores de Eh. Como doadores de elétrons elas utilizam quase todos os compostos orgânicos, desde ácidos orgânicos de cadeia curta até hidrocarbonetos, embora algumas espécies também sejam capazes de usar  $H_2$  (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; BARTON; TOMEI, 1995; POSTEGATE, 1984).

Outro fator inibitório em relação às BRS é que a redução desassimilativa de nitrato a nitrogênio gasoso, pelas BRN, produz intermediários como nitritos, óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $N_2O$ ) e amônia ( $HNO_4$ ), que possuem capacidade de elevar o potencial redox do meio tornando-o impróprio para as BRS (NEMATÍ; JENNEMAN; VOORDOUW, 2001).

Estes fatores demonstram que o decréscimo do nível de  $H_2S$  envolve principalmente a geração de um ambiente altamente oxidante em função da liberação de elétrons pela decomposição de íon nitrito em solução, resultando o aumento do seu potencial redox (STURMANN, 2001; STURMANN; GOERES, 1999; REINSEL *et al.* 1996).

De acordo com Lens *et al.* (1998) o sulfeto biogênico compreende as formas  $H_2S$ ,  $HS^-$  e  $S^{2-}$ , sendo a presença de cada espécie dependente do pH: em valores de pH abaixo de 7, há predominância sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ); quando o valor do pH situa-se entre 7 e 14 uma mistura de  $H_2S$  pode coexistir na solução, embora haja decaimento do nível de  $H_2S$  a medida que ocorre o aumento do pH. Valores acima de 9 promovem a dissociação de  $HS^-$  em  $S^{2-}$ . Sendo essa espécie química predominante em valores de pH acima de 10.

O mecanismo inibitório das BRS parece estar relacionado diretamente com o sulfeto de hidrogênio, como molécula neutra, pode atravessar sem obstáculo a membrana celular e reagir como componentes celulares (WEIJMA; BOTS;

TANDLINGER, 2002 apud VIEIRA, 2003; POL HULSHOFF; LENS; STAMS, 1998).

Li & Irvin (2007) observaram a variável potencial redox e alcalinidade, quando utilizadas como parâmetros de controle de processos de desnitrificação/nitrificação; a alcalinidade apresentou resultados mais satisfatórios que o potencial redox. Ressaltando a necessidade de aperfeiçoamento desses parâmetros de controle no referido processo.

#### 2.3.4.5 Ácidos Graxos Voláteis (AGV) e Alcalinidade

A relação AGV/alcalinidade é um indicador importante que pode ser utilizado para o monitoramento do pH, evitando reduções abruptas na produção do metano no meio. A alcalinidade é uma medida da quantidade de carbonato na solução (proveniente do CO<sub>2</sub> produzido durante a decomposição anaeróbia). A importância da alcalinidade na decomposição anaeróbia, reside no fato das bactérias acidófilas produzirem ácidos rebaixando o pH do meio, o carbonato reage com esses ácidos, controlando a acidez (tamponamento do carbonato). Essa ação mantém o equilíbrio entre as cepas acidogênica, acetogênicas e metanogênicas no sistema anaeróbico.

A alcalinidade total (AT) é função da alcalinidade devido a bicarbonato e a ácidos voláteis. No caso do percolado com origem no início do processo de bioestabilização, os resíduos orgânicos produzem percolado com baixa alcalinidade a bicarbonato e elevada alcalinidade devido a ácidos voláteis. À proporção que o processo entra na fase de equilíbrio dinâmico, a alcalinidade a bicarbonato passa a ser mais representativa quantitativamente.

Em sistemas anaeróbios é importante que alcalinidade se situe entre 2500 a 5000 MgCaCO<sub>3</sub>/L, para que haja condições de neutralizar uma eventual elevação das concentrações de AGV produzidos pelas bactérias acidogênicas e não consumidos pelas metanogênicas, expostas a ação de algum agente inibidor (SOUZA, 1982).

Van Haandel & Lettinga (1994), Foresti (1997) e Hirata (1997) afirmam que a espécie alcalina mais importante num sistema de decomposição anaeróbia é o íon bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), cuja origem resulta da liberação de espécies alcalinas a partir do metabolismo de proteínas, principalmente o amoníaco (NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH) (amonificação) e de formas oxidadas de enxofre, de sulfito (S<sup>-</sup> /HS<sup>-</sup>) e pela hidrólise de sais de ácidos orgânicos fracos.

#### 2.3.4.6 Fósforo

O carbono, nitrogênio e fósforo são essenciais a todos os processos biológicos da bactéria. A quantidade de nitrogênio e de fósforo necessária para a degradação da matéria orgânica presente em um determinado processo, depende da eficiência dos microrganismos em obterem energia para a síntese a partir de reações bioquímicas de oxidação do substrato orgânico (FORESTI *et al.* 1999).

O fósforo é um macronutriente, durante a decomposição da matéria orgânica pelos microrganismos determinadas quantidades de fósforo vão sendo assimiladas para a formação e o desenvolvimento de suas células (imobilização). O fósforo será incorporado nas bases nitrogenadas das bactérias (RNA e DNA), fosfolipídeos e outros, porém em maior quantidade nas moléculas de RNA. A proporção de fósforo na matéria orgânica, ou seja, a razão C/P na matéria orgânica determinará a predominância de imobilização ou mineralização.

Para Tchobanoglaus (1991) os principais mecanismos de remoção do fósforo entre outros elementos, em processos biológicos, são adsorção e a precipitação pela biosurfactação.

#### 2.3.4.7 Nitrato, Nitrogênio Orgânico e Nitrogênio Amoniacal

Nitrogênio orgânico e amoniacal são as principais formas presentes em águas residuárias domésticas e são frequentemente medidas como Nitrogênio Kjeldalh Total (BARNES & BLISS, 1983).

As proteínas remanescentes na fração orgânica do resíduo aterrado são convertidas em grande parte à amônia pela ação de bactérias heterotróficas em condições anaeróbias ou aeróbias. A amônia, o nitrito e o nitrato são compostos de nitrogênio formados a partir da decomposição da matéria orgânica. O processo de nitrificação e desnitrificação ocorre com alternância do regime aeróbio e anóxico, o primeiro permite a oxidação do nitrogênio amoniacal pelas bactérias nitrificantes e o segundo favorece a redução do nitrato com liberação do nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>).

O nitrogênio orgânico é convertido à amônia através da via bacteriana oxidativa e assimilado pelos microrganismos durante o crescimento. A amônia e nitrito são oxidados pelas bactérias nitrificantes numa sequência de reações, cujo produto final é o nitrato (nitrificação), porém existem gêneros bacterianos que

oxidam a amônia até nitrito, provocando acidificação do sistema. A oxidação anaeróbia da amônia consiste na substituição do oxigênio por óxidos de nitrogênio,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$  e o  $\text{N}_2\text{O}_4$ , sendo este a forma dímica do  $\text{NO}_2$  (KAMPSCHEREUR *et al.* 2005; JETTEN *et al.* 1999; SCHMIDT *et al.* 2002).

A presença de nitrogênio amoniacal é relevante introduzindo um caráter tóxico ao chorume. A amônia, por sua solubilidade e altas concentrações é um importante traçador da contaminação do chorume nos corpos hídricos. O aumento da taxa de recirculação do chorume é responsável pelo aumento da concentração da amônia.

De acordo com Wakida & Lerner (2005) a maior parte do nitrogênio encontrado em lixiviados está na forma de nitrogênio amoniacal devido às condições anaeróbias características nos aterros sanitários.

Segundo Junqueira (2000), a presença acentuada de amônia pode inibir o desenvolvimento de vários grupos bacterianos. A toxicidade da amônia é dependente da concentração do nitrogênio amoniacal e do pH, uma vez que a toxicidade é mais acentuada na presença do gás ( $\text{NH}_3$ ) do que em relação ao íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em pH elevado (acima de 8).

Não há consenso entre autores a respeito da faixa de inibição mais aceita dos grupos bacterianos, se é de 100 a 200 mg/L, para determinação dos diferentes limites de inibição. Calli *et al.* (2005), observaram que nenhum efeito inibitório foi causado devido a concentração de amônia para valores de amônia livre até  $161 \pm 12$  mg/L, Koster *et al.* (1984) observaram inibição com concentração de amônia livre superior a 700 mg/L e Hansen *et al.* 1998, a inibição foi observada somente para concentrações superiores a 1.100 mg/L de amônia livre.

#### 2.3.4.8 Sulfato, Sulfetos e Metais Pesados

A resolução Conama 357/2005 estabelece limites de concentrações máximo de 250 mg/L sulfato nas águas doces e 1,0 mg/L de sulfeto para lançamento de efluente em corpos hídricos.

Em ambiente anaeróbio e redutor as BRS reduzem o sulfato a sulfeto; os sulfetos gerados pelas BRS são úteis no processo de tratamento, tendo em vista que sua fração solúvel tem a propriedade de combinar-se com metais pesados, à exceção do cromo, formando sais insolúveis que não apresentam efeitos adversos ao processo, somente a fração solúvel dos metais pesados apresenta efeitos tóxicos

ou inibitórios à digestão anaeróbia.

A alcalinidade também pode atuar na precipitação de metais pesados, pois neutralizando a acidez, há um aumento do pH que tende a precipitar os metais fora da solução. Desta forma, a alcalinidade pode minimizar a ação inibidora dos metais no meio do processo, sendo um elemento antagonista (POVINELLI, 1987).

Conforme Chernicharo (1997); Souza (1982), cerca de 1,8 mg/L a 2.0 mg/L de metais pesados são precipitados como sulfeto metálicos pela adição 1,0 mg de  $S^{-2}$ . Assim, verifica-se a conveniência de que a relação mg  $S^{-2}$ /L (mg de metais pesados/L) assumam valores entre 0,5 e 0,56. Diga-se também que, além da redução do efeito adverso dos metais pesados, a combinação propicia também a diminuição da concentração dos sulfetos em solução, que também oferecem inibição. Este efeito de remoção de metais em solução é um mecanismo de segurança efetivo em pH inferiores aqueles em que temos a precipitação de cátions metálicos e carbonatos.

## 2.4 Biodegradabilidade

Uma substância ou composto é biodegradável quando for susceptível à decomposição pela ação dos microrganismos. Os microrganismos podem usar estes compostos como fonte de energia ou de carbono (ANGELIDAKI *et al.* 2004).

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados, enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis). Hidrocarbonetos com baixo e médio peso molecular e alcoóis são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis. Por outro lado compostos xenofóbicos (compostos químicos fabricados pelo homem), especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes a biodegradação. Geralmente compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e aumentando o grau de halogenação da molécula, diminui-se a sua biodegradabilidade (ALEXANDER, 1965 apud ATLAS, 1997).

Os microrganismos responsáveis pela degradação de compostos xenofóbicos são divididos: em primários e secundários, os primeiros possuem capacidade para degradar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os secundários não

utilizam o substrato principal, mas sim os produtos liberados pelos microrganismos primários. Este processo é denominado a cometabolismo (BULL e SLATER, 1982 apud GRADY, 1985).

A biodegradabilidade anaeróbia pode ser definida como a fração máxima de matéria orgânica que será eliminada, por digestão anaeróbia, durante um determinado período de tempo e em determinadas condições operacionais, em comparação à fração teórica estequiometricamente convertida (FIELD, *et al.* 1988; ROZZI *et al.* 2004).

Na literatura há uma escassez de trabalhos sobre a biodegradabilidade de lixiviados de aterros sanitários. Santos *et al.* (2004), em trabalhos relativos a tratamento de efluentes, avaliaram a biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia de lixiviados, demonstrando que na biodegradabilidade aeróbia do lixiviado ocorreu a remoção de 65% de DQO, sem a adição de inóculo e 87% com a adição de inóculo, sendo superior a degradabilidade anaeróbia com remoção de 60%.

A ocorrência de substâncias químicas recalcitrantes presentes, principalmente no chorume de aterros sanitários antigos, é determinante para o aumento da toxicidade do sistema, pois elas oferecem dificuldades para serem degradadas; considerando-se que os microrganismos são os principais agentes dos processos de degradação e reciclagem de nutrientes, sua incapacidade em degradar substâncias é um indício de recalcitrância do meio.

Aterros sanitários com mais de dez anos possuem alcalinidade alta, compostos nitrogenados, conforme mostra a tabela 3. A literatura cita que características como a idade do aterro, também tem influencia significativa na composição química do chorume.

Tabela 3 – Mudança dos valores de concentração de parâmetros de caracterização do chorume com a idade do aterro sanitário

<b>Parâmetro(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Idade do aterro sanitário (em anos)</b>			
	0-5	5-10	10-20	>20
<b>DBO</b>	10000-25000	1000-4000	50-1000	<50
<b>DQO</b>	15000-40000	10000-20000	1000-5000	<1000
<b>Nitrogênio Total</b>	1000-3000	400-600	75-300	<50
<b>pH</b>	3-6	6-7	7-7,5	7,5
<b>Fósforo</b>	100-300	10-100	-	<10
<b>Ferro e Magnésio</b>	500-1500	500-1000	100-500	<100

Fonte: EL-FADEL (2002).

### 3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

De acordo com a Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Canoas/RS – Brasil, (SMMA-2011), o Aterro Sanitário Guajuviras possui uma área de 13 hectares, encontra-se a uma distância de 10 km do centro da cidade, está localizado na Avenida Nazário, 3303, no Município de Canoas/RS, no bairro denominado Fazenda Guajuviras; seu acesso ocorre pela BR-116, através da Avenida Boqueirão. Atende uma população de 324.994 habitantes, recebe diariamente 300 toneladas de resíduos sólidos urbanos (Classe A), oriundos dos Municípios de Canoas e Nova Santa Rita, sendo que o Município de Canoas contribui com 250 toneladas desse total.

#### 3.1 Histórico do Aterro

O Aterro Sanitário Guajuviras iniciou suas operações em 1983 sob a forma de um lixão a céu aberto, modificou suas operações em 1988 transformando-se em um aterro controlado. Possui uma extensa cortina vegetal no seu entorno (Figura 1), cujo porte varia de árvores, arbustos até gramíneas. Possui licença ambiental expedida pelo IBAMA, o término da licença de operação ocorreu no dia 30 de novembro de 2010, nessa ocasião era administrado pela empresa Vega Engenharia Ambiental S.A. A licença de operação foi renovada pela FEPAM até 24.08.2012 (SMMA-2011). O aterro opera há 27 anos, portanto é um aterro considerado maturado conforme figura 1.

Figura 1 – Vista aérea do Aterro Sanitário Guajuviras na fase final das atividades



Fonte - Google Earth, 2011

### 3.2 Geração e Tratamento dos Percolados

A formação dos percolados nos aterros sanitários ocorre na transição da fase aeróbia para anaeróbia. O percolado originalmente é formado por enzimas expelidas pelos microrganismos, responsáveis pela degradação da matéria orgânica presente nos resíduos; em termos de quantidade e concentração o percolado pode aumentar pelos seguintes fatores: em períodos de intensa precipitação, condição operacional do aterro, tempo de concentração (exposição dos resíduos sem cobertura), grau de compactação, cobertura final (declividade e material impermeabilizante) e drenagem superficial da área do aterro (BIDONE, 2001).

O Aterro Sanitário Guajuviras gera, diariamente, 60 m<sup>3</sup> de percolados, que necessita ser tratado pela sua toxicidade. O sistema de drenagem e remoção do chorume é feito por gravidade, através de uma rede de canalização de concreto localizada na base do aterro, o efluente é captado para o tanque de acúmulo, com capacidade volumétrica de 78m<sup>3</sup> e distribuído a um sistema de cinco lagoas em série para receber tratamento (Figura 2); quatro delas com aeração natural (transferência do oxigênio atmosférico para a água) e, em maior parte, pela ação fotossintética dos vegetais clorofilados presentes na lagoa; na última lagoa a aeração é realizada de forma mecânica, com aeradores de superfície.

Essas lagoas estão interligadas por canalizações de PVC de 200 mm. A capacidade volumétrica das lagoas é variável, sendo a 1<sup>a</sup> e a 2<sup>a</sup> com 130 m<sup>3</sup> e a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> com 650 m<sup>3</sup> e, finalmente a 5<sup>a</sup> e última lagoa com 260 m<sup>3</sup>.

A geração de Percolados excede a capacidade de tratamento do sistema, por isso é necessário a retirada semanal de 17 cargas de chorume da Lagoa nº5, o equivalente a 22.000 litros para tratamento externo. Essa operação de gerenciamento do aterro contribui com o rebaixamento de apenas 5 cm do nível do percolado da lagoa a cada operação realizada.

Figura 2 – Operação de retirada do Percolado, Lagoa n°5



Fonte: sugestão do autor, 2011.

O aterro também está equipado com um sistema de tubulações para drenagem e remoção de gases; geomembranas de polietileno de alta densidade (PEAD) impermeabilizando toda a área das lagoas.

### **3.3 Reciclagem de Materiais**

A reciclagem de materiais consiste na retirada e no reaproveitamento de diversos tipos de materiais presentes na massa de resíduos sólidos. É necessário que haja demanda para aquisição e consumo dos materiais reciclados, caso contrário eles ficaram depositados nos locais de separação interrompendo o ciclo do produto.

#### **3.3.1 Coleta Seletiva**

A coleta seletiva consiste na separação dos resíduos a serem reaproveitados, nas suas fontes produtoras.

A implantação da coleta seletiva em programas de gerenciamento para resíduos sólidos urbanos, através das administrações municipais, representa uma decisão fundamental, trazendo benefícios sociais como: geração de emprego e

renda á comunidade envolvida no projeto, pela comercialização dos produtos; aumento o tempo de vida útil do aterro sanitário, pela redução do volume de resíduos dispostos nas células e economia de recursos naturais.

Outro fator de extrema relevância é a redução da toxicidade dos percolados no aterro sanitário, devido à ausência dos materiais recicláveis à massa de resíduos, isso contribui para o abrandamento da toxidez do chorume, pois íons derivados desses materiais não serão incorporados ao chorume.

A coleta Seletiva foi implantada no Município de Canoas desde 1993. A partir de 2001, o Município firmou convênio com a Metroplan, com apoio da Fundação de Estadual de Proteção ao Meio Ambiente (FEPAM) garantindo a construção de quatro galpões de triagem, facilitando o trabalho das Associações envolvidas no Projeto.

Apesar de os Galpões do Município de Canoas reciclar 70 toneladas de lixo ao mês, a atuação da coleta seletiva ainda é incipiente, porque o percentual de resíduos sólidos coletado em Canoas, no período de 2001 a 2007 e encaminhado para os galpões de reciclagem, foi menor que 5% do percentual total de resíduos coletado no período. Logo a grande parcela de RSU ainda esta sendo destinada nas células do aterro (SMMA, 2011).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Tendo em vista a restrição da legislação ambiental, no que tange aos limites de emissão de sulfatos e nitratos em corpos hídricos, em razão dos impactos causados à qualidade da água. Considerando os relatos na literatura indicando que a redução de sulfato, em ambientes anaeróbicos e ricos em matéria orgânica, contribui na formação de sulfeto de hidrogênio, composto com odor desagradável, extremamente tóxico, corrosivo e com alto DBO.

Este trabalho investigou a aplicação de bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, na forma isolada ou consorciada, em processos de biorremediação e sua possibilidade em reduzir teores de nitrato, fosfato, sulfato e/ou nitrogênio total em percolados parcialmente tratados de aterros sanitários.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial do bioprocesso a partir do emprego de bactérias, isoladamente e em consórcio, em contato com chorume de aterro sanitário (resíduos Classe A), aferindo seu desempenho na biotransformação desse efluente;
- Analisar a composição química do composto lixiviado, quanto aos parâmetros fósforo, nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total e sulfato, pH, eletrocondutividade e temperatura;
- Aperfeiçoar as condições de processos microaerófilos visando o uso de linhagens de *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* na redução de sulfatos e nitratos;
- Determinar a capacidade de oxidação e redução (Eh) e variação do potencial hidrogenônico (pH) do composto lixiviado pelos microrganismos testados.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Coleta e Preparação das Amostras

O percolado utilizado neste experimento foi recolhido da lagoa nº5, do sistema de tratamento de efluentes do Aterro Sanitário Guajuviras. O conjunto é composto por cinco lagoas de tratamento primário (remoção de partículas coloidais e estabilização do pH). A escolha da área foi decorrente da proximidade do centro de estudo, bem como pelo convênio de colaboração científica existente entre o Aterro Sanitário Guajuviras e o Instituto La Salle. Foram feitas cinco coletas do percolado, todas na Lagoa nº5, no período da manhã e em dias diferentes; a amostragem ocorreu em períodos climáticos sem qualquer precipitação pluviométrica. O volume total do coletado foi 50.000 mL, para o qual foram utilizados cinco recipientes de plástico com capacidade de 10.000 mL. As amostras foram transportadas para o laboratório em condições de refrigeração. No momento das coletas foram registrados dados referentes à temperatura e pH. Todas as coletas foram realizadas pelo mestrando na presença do químico responsável pelo projeto, seguindo normas pré-estabelecidas, relativa à coleta de água para análise (EPA, 2010).

### 5.2 Tratamento parcial do efluente

As amostras foram separadas em laboratório e em seguida submetidas aos testes de precipitação, através do seguinte protocolo: Equipamento utilizado: "JAR-TEST" marca "QUIMIS"; 2 Béqueres de 2000 mL, sendo adicionado 1500 mL em cada; realizada a homogeneização por 2 minutos, à rotação de 120 RPM, foi adicionado 3000mg/L de tanino em cada Becker e mantido a rotação de 120 RPM por 2 minutos, após mais 5 minutos em rotação de 30 RPM, descrito no item 5.3. Aguardado decantar o floculante e segregado 1750 mL do sobrenadante. O sobrenadante apresentou pH 8,7, sendo ajustado para pH 7,5 com uso de ácido acético a 20%. Após o fracionamento das amostras em seis (06) *erlenmeyers* de 250 mL cada, o efluente foi suplementado com fonte de carbono, sendo os frascos fechados com tampas de papel alumínio/celulose, e esterilizados em autoclavagem vertical, a 121° C, a 0,5 atm pelo tempo de 10 min. e resfriadas. A partir desse momento o líquido foi denominado de efluente tratado. As linhagens bacterianas

foram cultivadas e caracterizadas no laboratório. Uma amostra do efluente foi enviada para o laboratório para análise quanto a sua composição química antes da inoculação. Após a inoculação dos microrganismos no efluente tratado o mesmo denominou-se efluente preparado. A inoculação foi feita em 06 frascos de 250 mL cada, totalizando um volume de 1500 mL, foram incubados em incubadora de agitação orbital tipo *shaker*, a 32° C, 60 ciclos/min., no período de 32 dias. Durante o tempo de incubação foram coletadas amostras dos frascos e plaqueadas, com o objetivo de verificar-se o comportamento microbiano e estabelecer assim a curva de crescimento bacteriano. No final período de 32 dias foram coletadas alíquotas e enviadas novamente para análise laboratorial quantos aos parâmetros proposto no experimento. Foi possível observar o crescimento e contagem das colônias e a mudança dos parâmetros avaliados, entre eles a redução dos níveis de sulfato e nitrato do efluente, demonstrando possibilidades futuras de aplicação em bioprocessos.

Para a precipitação do efluente foram empregados taninos, evitando a utilização de sais de alumínio e ferro para não interferir na interpretação dos resultados do trabalho, já que o foco do estudo é o monitoramento das concentrações de sulfatos e nitratos do efluente.

Os ensaios foram realizados em triplicata, seguido de uma bateria de frascos considerados como “branco”.

### 5.3 Taninos

O tanino utilizado no experimento é da marca ACQUAPOL<sup>®1</sup> WM com concentração de 25%(v/v). São compostos polifenólicos encontrados em uma grande variedade de plantas superiores, com características adstringentes e utilizadas nas indústrias, no tratamento de seus efluentes. As vantagens da utilização dos taninos: são preservados após as modificações químicas, capacidade de combinar-se com proteínas e metais, além de ser um produto obtido de fontes renováveis, podendo ser biologicamente degradado ou eliminado termicamente.

---

<sup>1</sup> Produzido por: Acquaquímica LTDA; Aplicações Químicas - Integrante do Grupo Seta/AS.

## 5.4 Análises Físico-químicas

### 5.4.1 Nitratos e Sulfatos

As determinações de Nitratos e Sulfatos em solução seguiram a metodologia do APHA, “*Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater*” (CLESCERI *et al.* 1989), por meio de laboratório externo com certificação da Rede Metrológica.

O experimento teve o tempo de duração de trinta e dois (32) dias, sendo as análises físico-químicas realizadas no início e final do ensaio, os resultados encontram-se expressos na tabela 6, nas colunas resultado inicial e final.

### 5.4.2 Medidas de pH, Eh, DQO, DBO<sub>5</sub> e OD

Foram analisados os parâmetros pH e temperatura das lagoas do sistema de tratamento vide tabela 4. As medidas de pH e Eh foram feitas em um medidor digital de pH/ milivolt ANALION, modelo IA 601 com eletrodo combinado universal ANALION, modelo V 620 (no caso de pH) e eletrodo ANALION, modelo ROX 673A (no caso de Eh). DQO, DBO<sub>5</sub> e OD seguiram os procedimentos determinados pelo “*Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater*”. Para a determinação destes parâmetros seguiram-se os mesmos tempos descritos para os parâmetros do item 5.5.3.

## 5.5 Microrganismos

Foram utilizadas duas linhagens bacterianas: *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ambas as culturas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Unilasalle. A caracterização das linhagens foi feita seguindo os protocolos de identificação bioquímica estabelecidos por Konemann (2009).

No caso do gênero *Bacillus* foram realizados testes para a diferenciação de outros membros do grupo (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus mycoides*) e submetidos ao cultivo em meios de cultura quimicamente definidos para se obter a caracterização segura da espécie em questão (Anexo A).

### 5.5.1 Seleção e Preparação do Pré-inóculo

As bactérias encontravam-se acondicionadas em *freezer* à temperatura de -24 °C, por isso necessitaram ser descongeladas para a preparação do pré-inóculo. A incubação foi feita em caldo de enriquecimento (anexo A) em estufa a  $37 \pm 2$  °C por 24 horas, para obter-se o pré-inóculo.

Após o crescimento do pré-inóculo, foi retirada uma alíquota do meio com crescimento bacteriano e inoculado em dois *Erlenmeyers* de 100 mL, com meio de cultura Ágar BHI (Caldo de Infusão de Cérebro e Coração) (anexo A), a fim de obter a concentração bacteriana desejável para posterior inoculação nos frascos com amostras de efluente tratado. Os frascos foram incubados em estufas a 37°C, por 24-48 horas.

A concentração desejável de célula bacteriana ficou entre  $10^3$  a  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo estipulada por leitura da densidade ótica (D.O) em espectrofotômetro (660 nm) e acompanhada pela contagem em placas.

### 5.5.2 Inoculação dos Microrganismos e Formação dos Consórcios

O experimento microbiológico foi realizado utilizando-se um conjunto de seis (06) frascos *erlenmeyers* de 250 mL, em três seqüências de testes, todas elas contendo a mesma composição: efluente tratado mais solução peptonada 1% (peptona bacteriológica como fonte de carbono), (Figura 3).

Figura 3 - Efluente tratado, Laboratório de Microbiologia Unilasalle.



Fonte: sugestão do autor, 2011.

Assim os frascos foram inoculados da seguinte forma:

**a)** no primeiro experimento foi utilizado o *Bacillus cereus*; onde duas seqüências de *erlenmeyers* com 250 mL de efluente tratado foram inoculados com cultura bacteriana, denominados como B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>;

**b)** o segundo experimento foi realizado de forma idêntica a incubação anterior, porém utilizando-se o consórcio formado por ambos os microrganismos. Assim os frascos foram inoculados com o consórcio *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, denominados como P/B<sub>1</sub> e P/B<sub>2</sub>;

**c)** no terceiro experimento repetiram-se as rotinas anteriores, desta vez utilizando-se apenas a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, denominado como P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

As etapas de manipulação das amostras de efluente preparado e dos inóculos foram todos feitos em capela de fluxo laminar vertical.

Durante os ensaios, os *erlenmeyers* foram vedados com rolhas de silicone contendo uma entrada para realizar a purga de ar e H<sub>2</sub>S com nitrogênio. A saída lateral desses frascos, por onde esses gases seriam expulsos, foi conectada através de uma mangueira de silicone, à tampa de silicone de outro *erlenmeyer*, contendo água com pH próximo a 8, ajustado com uma solução de NaOH 0,1 mol/L. Ao final

da purga, o sistema foi totalmente fechado, de tal forma que, a mangueira de entrada do frasco de ensaio e da saída lateral do frasco de coleta de gases foi comprimida com uma pinça de Hoffman, impedindo a entrada de ar.

Os ensaios foram conduzidos à temperatura a  $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , e sob agitação constante de 60 ciclos/min., em incubadora orbital (Shaker KS 4000i Control IKA), por um período de 32 dias (Figura 4).

Figura 4 - Incubadora orbital (Shaker KS 4000i Control IKA), com efluente preparado



Fonte: sugestão do autor, 2011.

### 5.5.3 Determinação da curva de crescimento Bacteriano

Quando uma cultura microbiana se desenvolve em um sistema fechado é possível se confeccionar uma curva de crescimento, que pode ser dividida em diferentes etapas: fase lag, log, estacionária e de declínio ou morte. A fase lag é caracterizada por um rearranjo do sistema enzimático (síntese de enzimas), produtos tóxicos e meio de cultura. Não há variação da concentração de biomassa no decorrer do tempo. Na fase Log ou exponencial as células estão plenamente adaptadas, com velocidade de crescimento elevadas, consumo intenso de substrato e acúmulo de produtos no meio. A fase estacionária marca o término do substrato limitante, acúmulo de produtos tóxicos, concentração celular constante em seu valor

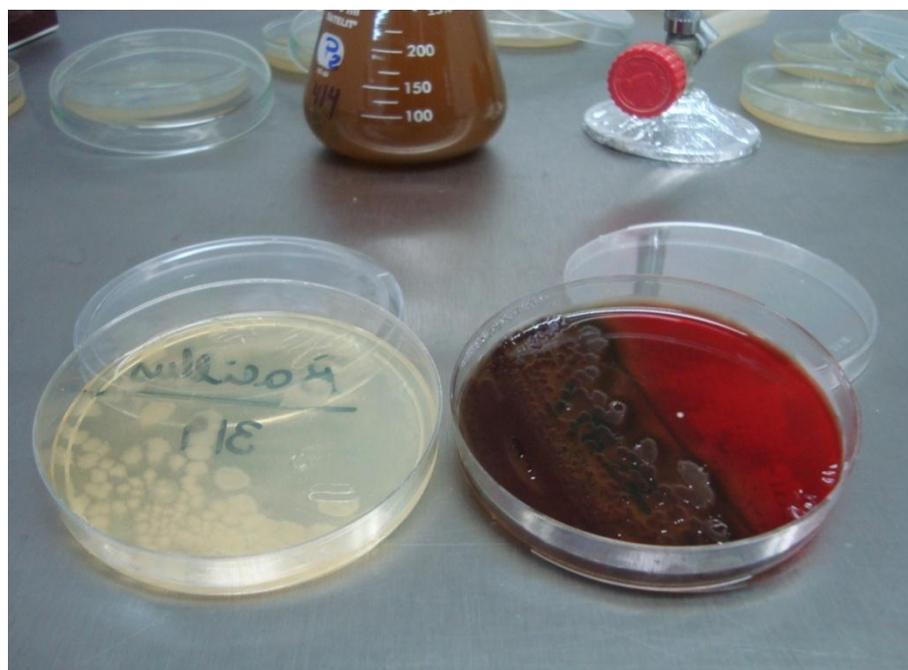
máximo. A Fase de declínio ocorre a redução do crescimento celular e o consumo de material intracelular (lise). Não somente a concentração celular se dispõe no gráfico, mas também o consumo de substrato e formação de subprodutos. (TORTORA, 2000 e TRABULSI, *et al.* 2008).

Para a determinação da curva de crescimento foram feitas contagem nos Tempos de Análises (T), definidos como  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ , com intervalo de 10, 12 e 10 dias, totalizando 32 dias. Desta forma a sequencia de avaliação do comportamento microbiano compreendeu as seguintes etapas:

**a. Amostragem dos ensaios e diluições:**

De cada frasco do ensaio ( $P_1$ ,  $P_2$ ;  $B_1$ ,  $B_2$ ;  $P/B_1$  e  $P/B_2$ ) foi separado uma alíquota de  $20\mu\text{L}$ , a qual foi diluída num tubo contendo 10 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) 0,1% (anexo A), obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Este procedimento foi repetido para a obtenção das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ . As diluições foram necessárias para a contagem das bactérias e impedir o crescimento desordenado verificado na placa de Petri localizada à direita da Figura 5.

Figura 5 – Placas de Petri com crescimento bacteriano em diferentes concentrações



Fonte: sugestão do autor, 2011.

Apenas as concentrações  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  provenientes de cada diluição foram semeadas, isso porque nos tubos muito diluídos não haveria células suficientes, ao

mesmo tempo em que nos tubos muito concentrados haveria excesso de células.

Segundo TRABULSI *et al.* (2008), neste método, alíquotas de diluições seriadas da amostra são semeadas em meio de cultura sólidos adequados e incubadas de maneira a permitir o crescimento das unidades formadoras colônias (UFC) isoladas.

**b. Contagem e identificação das Bactérias indicadoras:**

Para a quantificação e isolamento das bactérias indicadoras, foi utilizado o método de contagem “*Spreadplate*” em Ágar Plate-Count (PCA) (MERCK).

Com auxílio de uma pipeta automática com ponteira estéril, foram depositados 20 µL de cada diluição, na superfície de placas de Petri de tamanho (90x15 mm), contendo PCA. Com auxílio da alça de Drigalsky ou um bastão de vidro tipo “hockey” flambado, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio até a completa absorção.

As placas de Petri foram incubadas invertidas para evitar que gotículas provenientes do vapor fossem incorporadas ao efluente já diluído.

Após o plaqueamento as placas foram incubadas em estufa a  $32 \pm 2$  ° C, por 24 horas, após esse período os pequenos agrupamentos cresceram isoladamente e foram contadas as UFC mL<sup>-1</sup>, para posterior elaboração da curva de crescimento bacteriano.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises iniciais foram feitas em todas as lagoas do sistema de tratamento de efluente do aterro sanitário, para a determinação e caracterização dos parâmetros pH, temperatura e Eh do percolado, descritas em média na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de pH, temperatura e potencial redox (Eh) verificados no percolado gerado pelo aterro, no momento da Coleta

Parâmetros	pH	Temperatura	Eh (mV)
Tanque de Acúmulo	8,15	26,4°C	+26
Lagoa 1	8,25	26,4°C	+102
Lagoa 2	8,25	26,4°C	+113
Lagoa 3	8,43	26,4°C	+133
Lagoa 4	8,43	26,4°C	+192
Lagoa 5	8,43	26,4°C	+190

Fonte: sugestão do autor, 2011.

### 6.1 Temperatura e pH

A temperatura do percolado se manteve constante em todas as lagoas e muito próxima a temperatura ambiente na data da medição, a qual foi de 25°C; o valor do pH apresentou pequena variação entre as lagoas. Foi possível constatar-se um crescimento do potencial redox, a partir do tanque de acúmulo até a lagoa 5; o potencial redox apresenta uma relação direta com o pH, pois em valores perto ou acima de 7, o potencial redox torna-se mais eletropositivo por unidade de pH. Esse achado também é similar ao de Smayda (1990), ao analisar amostras de lodos de bacias de sedimentação em estações de tratamento de esgotos domésticos.

### 6.2 Contagem das Bactérias

Após a incubação realizou-se a contagem das bactérias. O cálculo foi obtido multiplicando-se o número de colônias contadas pelo fator de diluição.

As figuras abaixo mostram a contagem do número de colônias em placas de Petri, com auxílio da lupa. Quanto ao padrão de crescimento das colônias, os microrganismos apresentaram diferenças morfológicas: a *Pseudomonas aeruginosa*, na concentração  $10^{-4}$ , mostrou um padrão circular, com tamanho reduzido e cor homogênea (Figura 6-A), bem diferente daquele exibido na concentração  $10^6$ , onde

a colônia mostrou uma série de bandas concêntricas marcadas pelas cores claras e escuras, bem como um aumento de tamanho (Figura 6-C). O *Bacillus cereus* apresentou aspectos rugosos em forma de galáxias, cores translúcidas e tamanhos maiores, quando se apresentou na forma pura (Figura 6-D); por outro lado, verificou-se alteração da morfologia das UFC na forma consorciada, exibindo tamanhos reduzidos (Figura 6-B). Esse comportamento pode ser indicativo de inibição biocompetitiva com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*.

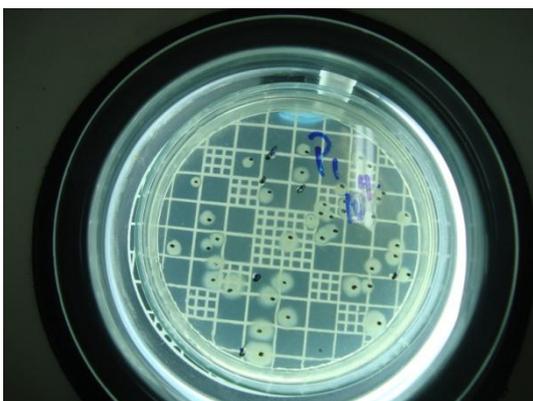


Figura 6-A Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em Placas de Petri, na concentração  $10^{-4}$ .  
Fonte: sugestão do autor, 2011.

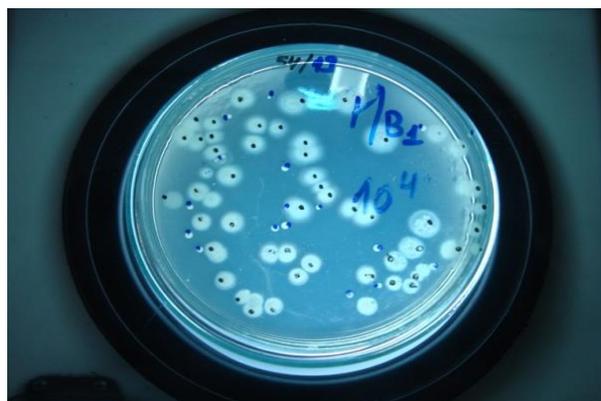


Figura 6-B Crescimento do Consórcio em Placas de Petri, na Concentração  $10^{-4}$ .  
Fonte: sugestão do autor, 2011.

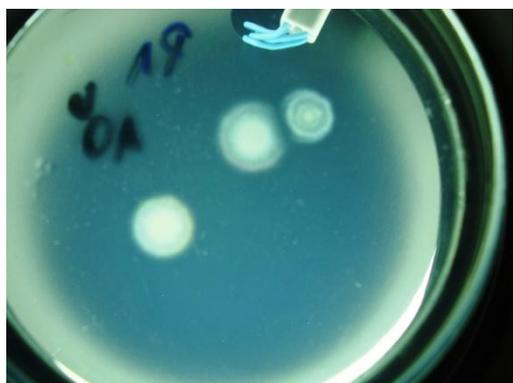


Figura 6-C Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em Placas de Petri, na concentração  $10^{-6}$ .  
Fonte: sugestão do autor, 2011.



Figura 6-D Crescimento de *Bacillus cereus* em Placas de Petri, na concentração  $10^{-3}$ .  
Fonte: sugestão do autor

### 6.3 Fases de crescimento Bacteriano

Em microbiologia o termo crescimento se refere a um aumento no número de células e não de suas dimensões celulares, logo crescimento populacional indica a variação do número ou massa de microrganismos por unidade de tempo.

O crescimento bacteriano ocorre por fissão binária no qual a divisão de uma

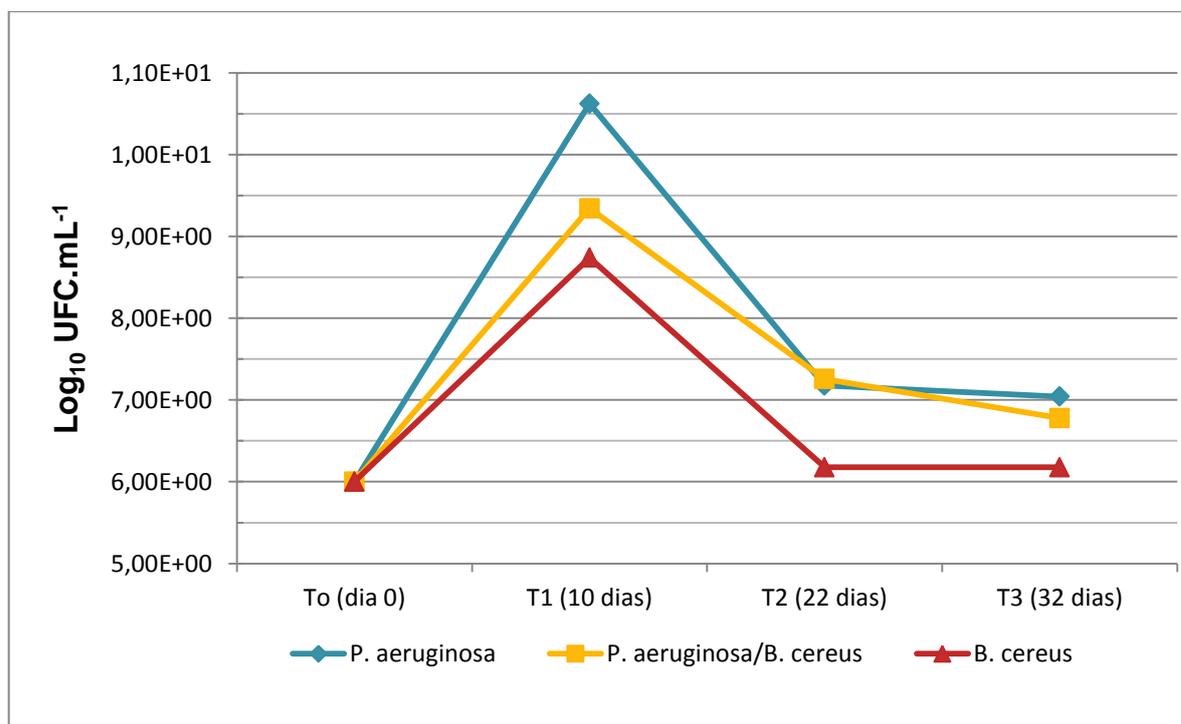
única célula resulta em duas novas células, estas irão dividir-se produzindo quatro células, oito células novas e assim por diante.

### 6.3.1 Curva de crescimento Bacteriano

A contagem das colônias e os valores para a construção da curva de crescimento ocorreram nos tempos  $T_0=0$ ,  $T_1=10$ ,  $T_2=22$ ,  $T_3=32$  dias.

As fases de crescimento mencionadas no item 5.5.3, não estão presentes integralmente neste estudo; a fase lag e a fase estacionária não foram visualizadas na Figura 7, portanto as culturas apresentaram apenas duas fases significativas: Log e de declínio.

Figura 7 – Determinação da curva de crescimento bacteriana através da contagem em placa de unidade formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL), das linhagens bacterianas testadas



Fonte: sugestão do autor, 2011.

A fase lag, embora tenha ocorrido durante o pré-inóculo, não foi monitorada no presente estudo. Em relação à ausência da fase estacionária, a mesma não se manifestou durante o ensaio. É possível que o não aparecimento da fase estacionária se deva a escolha de intervalos demasiadamente longos durante o

ensaio entre os tempos  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ .

Segundo Italiani e Marques (2003) a entrada em fase estacionária bem como a sua duração é causada por uma mudança no padrão de expressão gênica de bactérias, quando as células devem expressar um novo conjunto de genes envolvidos principalmente com resistência à carência alimentar e a estresses ambientais.

Analisando a Figura 7 observa-se que no intervalo de tempo de  $T_0=0$  a  $T_1=10$  dias, todos os microrganismos obtiveram crescimentos significativos, sendo que seu ótimo foi atingido no intervalo de tempo igual a 10 dias; notou-se também que o crescimento mais expressivo pertenceu ao microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* ( $P_1$ ), seguido pelo consórcio ( $P/B_1$ ); por outro lado verificou-se que o microrganismo que menos cresceu foi *Bacillus cereus* ( $B_1$ ). O intervalo correspondente  $T_0=0$  a  $T_1=10$  dias foi considerado como a fase log, uma vez que essa etapa apresentou a maior taxa de crescimento dos microrganismos durante todo o experimento.

A fase de declínio bacteriano está representada por uma reta com dois segmentos: **a)** no primeiro segmento, intervalo  $T_1=10$  dias e  $T_2=22$  dias, foi possível observar-se uma queda do número de todos os microrganismos; a *Pseudomonas aeruginosa* ( $P_1$ ) foi o microrganismo que mais cresceu na fase log, porém na fase de declínio teve uma queda de 3,5 ciclos logarítmicos. Constatou-se ainda que o consórcio ( $P/B_1$ ), o qual teve um crescimento moderado na fase log, também decresceu moderadamente na fase de declínio; finalmente o *Bacillus cereus* ( $B_1$ ), foi o microrganismo que apresentou maior regularidade no experimento, tendo uma taxa de crescimento igual a taxa de decaimento; **b)** observa-se que no segundo segmento da reta de declínio, intervalo  $T_2=22$  dias e  $T_3=32$  dias, a *Pseudomonas aeruginosa* ( $P_1$ ) e o consórcio ( $P/B_1$ ) continuam a fase de decaimento, enquanto o *Bacillus cereus* ( $B_1$ ) mostrou estabilidade, com a reta tendendo a horizontalidade. Esse comportamento pode ser indício de que o *Bacillus cereus* é um microrganismo adaptado a ambientes com carência nutricional, tendo uma constante de saturação baixa, necessitando de pequenas concentrações de substrato, propriedade revelada pelas bactérias recolhedoras.

O Estágio  $T_2=22$  a  $T_3=32$  mostra um padrão similar à etapa estacionária, presente nas curvas de crescimento bacteriano, em experimentos controlados, realizados em laboratório (TORTORA *et al.*2000).

Para Robazza, Teleken e Gomes (2010) os resultados obtidos pelo ajuste dos

dados de crescimento, através do monitoramento de uma linhagem de *Pseudomonas* indicam que o modelo empregado consegue reproduzir com precisão as diferentes fases presentes no crescimento deste microrganismo.

Estes resultados tendem a fortalecer a convicção que os padrões de crescimento observados em regimes dinâmicos de temperatura correspondem a um comportamento próximo do que é observado em situações ambientais. Embora esses estudos tenham sido realizados com parâmetros pré-estabelecidos e as variações observadas, se tornam um fator explícito para a presença ou ausência da fase *lag*, sendo um passo importante para que o modelo proposto nesse experimento possa ser utilizado com confiança pela indústria de alimentos.

#### **6.4 Ensaios Físico-Químicos**

As análises físico-químicas do efluente, realizadas pelo laboratório correspondem ao efluente tratado e efluente preparado denominados, respectivamente, como inicial e final Tabela 6; o intervalo entre as duas etapas foi de trinta e dois (32) dias. Ao final deste período as células de cada *erlenmeyer* foram separadas pela filtração a vácuo e o efluente encaminhado ao laboratório para análise final.

Foram analisados os parâmetros: pH, Eh, OD, DBO<sub>5</sub>, DQO e Proteínas Totais. Conforme a tabela 5, os valores de pH não apresentaram variações significativas em relação ao efluente tratado (Inicial), mantendo-se próximo a neutralidade durante o experimento. Os valores encontrados se enquadraram dentro dos limites estabelecidos pela legislação, cujos valores variaram na faixa de 5 -9.

A concentração do oxigênio dissolvido (OD) teve uma variação em relação ao efluente tratado (Inicial), situando-se abaixo dos valores estabelecidos na Resolução Conama 357/2005, à exceção da classe de águas doces classe 4, cujo o valor da concentração de OD deve ser superior a 2 mg/L O<sub>2</sub>, porém a média final persistiu dentro do limite para um processo aeróbio facultativo.

Conforme se observou, os valores do potencial redox (Eh) se mantiveram positivos durante todo o experimento, podendo ser interpretado como possível resultado da redução desassimilativa de nitrato a nitrogênio gasoso pelas BRN, fator esse que eleva os valores do Eh do meio.

Tabela 5 - Valores dos parâmetros físico-químicos: pH, Eh, OD, DBO<sub>5</sub>, DQO e Proteínas Totais nos tempos de análises T<sub>inicial</sub> e T<sub>final</sub> para os diferentes microrganismos e seus consórcios.

Parâmetros	Unidade	Resultados das Análises				Metodologia	Limite de Detecção (mg/L)
		Tratado	Preparado				
			P	B	P/B		
pH	-	7,75	6,6	6,85	7,07	Potenciômetro <sup>1</sup>	0,1**
OD	mg/L	3,20	1,02	2,8	2,09	St. Meth. nº 4500-OC	0,02 -50 ppm
Eh	mV	+320	+309	+130	+211	Potenciômetro <sup>1</sup>	+/-20 mV
DBO <sub>5</sub>	mg/L	1260	776	660	709	St. Meth. nº 5210-B	1mg/L
DQO	mg/L	3359	965	768	890	St. Meth. nº 5220-B	5mg/L
Proteínas Totais	g/Dl	2,79	4,75	3,74	4,1	Método Colorimétrico do Biureto (LabTest® Diagnostic-BR)	0.6 g/L

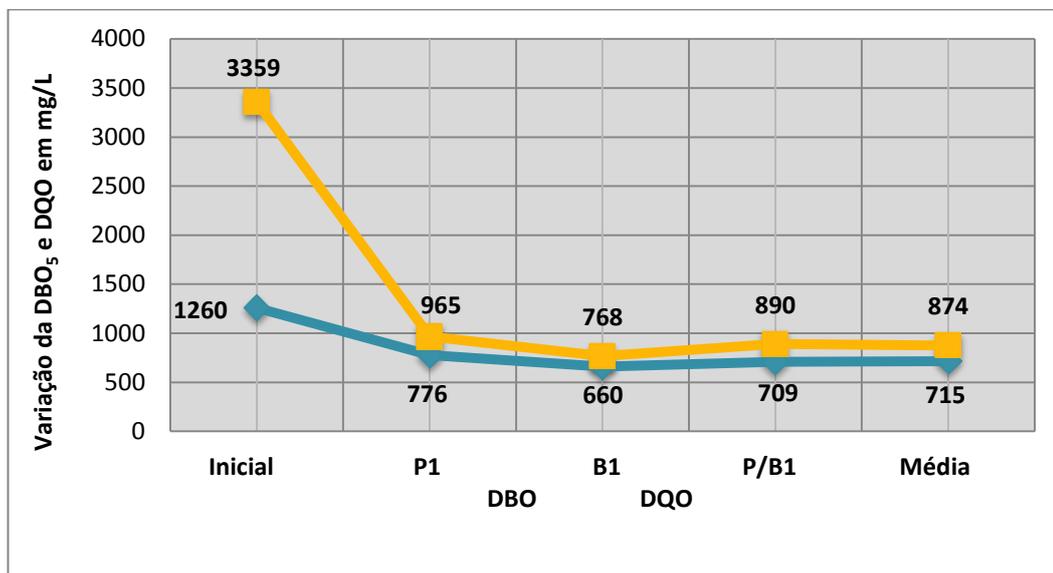
\* Média das triplicatas de cada microrganismo e seu consórcio. 1- Modelo ANALION ROX 673A e V 620. \*\*nível de resolução. \*\*\*após suplementação proteica. \*\*\*\*valores relativos aos padrões de incerteza instrumental.

**Legenda:** P- *Pseudomona aeruginosa*; B – *Bacillus cereus*; P/B – Consórcio *Pseudomonas* e *Bacillus cereus*.

Fonte: sugestão do autor, 2011.

Os valores de DBO<sub>5</sub> medidos no percolado (Tabela 5) indicam uma atividade efetiva dos microrganismos, estabelecendo níveis médios de degradabilidade. Conforme a Figura 8, os valores de DBO obtidos pelos microrganismos *Bacillus cereus* (B<sub>1</sub>) e consórcio (P/B<sub>1</sub>) atingiram percentuais em torno de 48% e 44%, respectivamente, logo situaram abaixo do valor mínimo estabelecido pela Resolução Conama 430/2011, cujo valor mínimo da remoção é de 60%. Por outro lado, a relação DBO<sub>5</sub>/DQO do efluente tratado (inicial) e do preparado (final) a média foi de 0,81. Esse valor que indica uma atuação positiva dos microrganismos, pois a degradabilidade do efluente é alta quando a relação DBO<sub>5</sub>/DQO se aproxima de 1.

Figura 8 - Variação da DBO<sub>5</sub> e DQO decorrente da atividade dos microrganismos durante o experimento



Fonte: sugestão do autor, 2011.

Neste ensaio houve aumento da concentração das proteínas totais em relação ao efluente tratado (inicial), quando o resultado esperado seria a sua redução.

Os valores relativos à suplementação da fonte de carbono do efluente tratado, foram considerados computadas no presente estudo, bem como os devidos ajustes.

A justificativa para o crescimento da concentração das proteínas pode estar associada à produção de bacteriocinas, compostos proteicos produzidos pelas bactérias, que apresenta efeito inibidor entre às espécies.

O efeito do crescimento também pode estar relacionado à produção de diferentes de tipos de proteínas e ácidos orgânicos (fórmico, acético e oxálico) excretados pelas bactérias fermentativas durante a fase de crescimento.

Os valores de pH se mantiveram constantes durante o experimento e dentro da faixa de neutralidade. Há relatos na literatura indicando que a atividade proteolítica, o consumo de proteínas pelas bactérias, é evidenciado quando o valor do pH do meio passa a apresentar valores alcalinos.

### 6.5 Análise da Concentração dos Parâmetros Fósforo Total, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal, Nitrogênio Total e Sulfato No Efluente.

Os resultados da análise da concentração dos parâmetros fósforo total, nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total e sulfato se encontram na tabela 6. A tabela foi

separada em dois campos: o efluente tratado (inicial) e o efluente preparado (final) e representa o comportamento da concentração dos parâmetros analisados no presente estudo.

Tabela 6 - Determinações dos parâmetros físico-químicos do efluente, nos tempos de análises  $T_{inicial}$  e  $T_{final}$ , para os diferentes microrganismos e seu consórcio.

Parâmetro	Unidade	Resultados				Método	Limite de Detecção
		Tratado	Preparado				
			P <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	P/B <sub>1</sub>		
Fosfato Total	mg/L	5,71	4,52	9,13	2,85	Standard Methods 21 st Método 4500-P-B	0,001
Nitrato (como N)	mg/L	13,2	14,93	12,4	12,7	Standard Methods 13 st	0,010
Nitrogênio Amoniacal	mg/L	494	359,4	567,8	399	Standard Methods 21st – Métodos 4500 NH <sub>3</sub> – B e C.	0,140
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg/L	693	859	856	676	Standard Methods 21st – Métodos 4500 Norg –B e D/4500 NH <sub>3</sub> – C.	0,140
Sulfato	mg/L	6,30	5,4	1,91	5,9	Standard Methods 21st - Método 4500 SO <sub>4</sub> -2/E	0,057

Legenda: P- *Pseudomonas aeruginosa*; B – *Bacillus cereus*; P/B – Consórcio *Pseudomonas* e *Bacillus*.

Fonte: Referência de análises realizadas pelos Laboratórios ALAC Ltda.

### 6.5.1 Fósforo Total

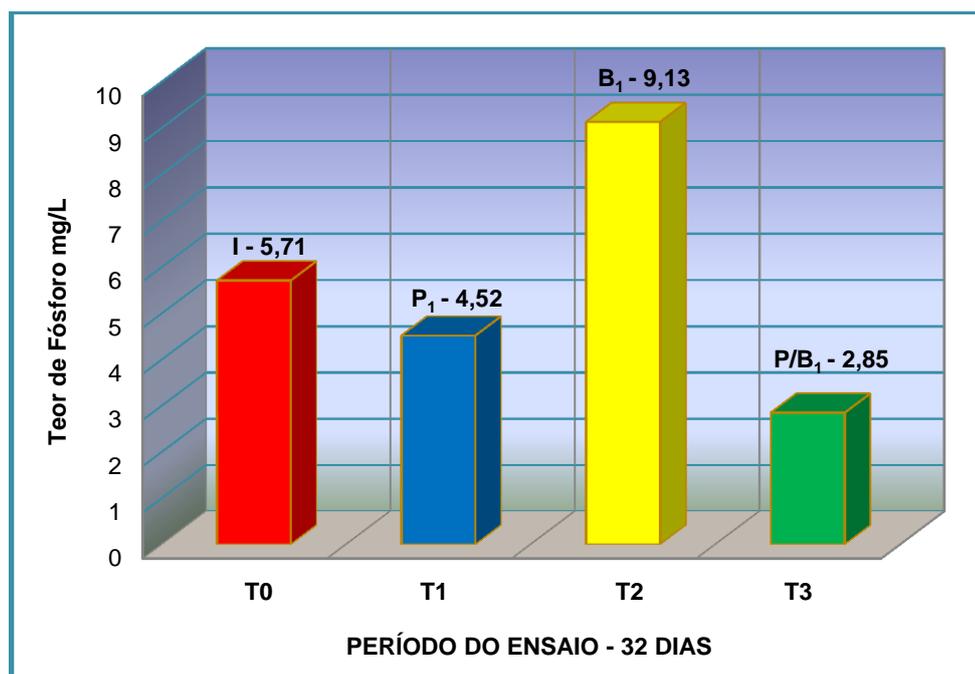
A remoção do parâmetro fósforo observada no experimento ocorreu principalmente devido à assimilação por crescimento bacteriano, quando em consórcio, o que provavelmente foi devido à propriedade surfactante dada pela espécie *Pseudomonas*.

Houve redução da concentração do parâmetro fósforo durante o ensaio, conforme se verifica na Figura 9, através da ação dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* (P<sub>1</sub>) do consórcio (P/B<sub>1</sub>), atingindo, respectivamente, valores na ordem de 1,03 mg/L e 2,85 mg/L, demonstraram que a forma consorciado foi mais efetiva na redução do parâmetro. Por outro lado, o microrganismo *Bacillus cereus* (B<sub>1</sub>), apresentou comportamento anômalo durante o ensaio, quando aumentou o valor da concentração do fósforo para 3,58 mg/L, ultrapassando o valor da concentração do efluente tratado.

O aumento da concentração do fósforo, apresentado pelo microrganismo *Bacillus cereus* pode estar relacionada ao acúmulo de nutrientes no efluente e

também a valores de pH neutro, possibilitando a solubilização do fosfato, como também a processos de quebra de proteínas e lise de células antigas. Esse comportamento reforça a hipótese de que o microrganismo *Bacillus cereus* manifestou a forma recolhadora em relação às altas concentrações de nutrientes, demonstrando necessitar de cotas mínimas de nutrientes para seu crescimento.

Figura 9 – Variação do teor de Fósforo



Legenda: I – Efluente Tratado; P<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa*; B<sub>1</sub> – *Bacillus cereus*; P/B<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa* / *Bacillus cereus*.

Autoria: sugestão do autor, 2011.

### 6.5.2 Nitrato

O Parâmetro nitrato apresentou teores de concentração acima daqueles estabelecidos pela Resolução Conama 357/2005, no efluente tratado (inicial) e no preparado (final). A Figura – 10 releva um desempenho discreto dos microrganismos *Bacillus cereus* (B<sub>1</sub>) e do consórcio *Pseudomonas aeruginosa*/ *Bacillus cereus* (P/B<sub>1</sub>), verifica-se que os valores da redução do parâmetro foram semelhantes e próximos ao valor do efluente tratado; enquanto a *Pseudomonas aeruginosa* (P<sub>1</sub>) teve níveis de redução acima do valor do efluente tratado (inicial).

A desnitrificação, remoção do nitrogênio através da redução do nitrato a nitrito, óxido nítrico, nitroso e formação de nitrogênio molecular, não foi efetiva no presente

ensaio, apesar de estarem presentes os requisitos necessários para o processo: condições anaeróbias, uma demanda de matéria orgânica para fornecimento de elétrons e redução do nitrato. Conforme relatos da literatura, tanto as bactérias *Pseudomonas* como *Bacillus*, são microrganismos efetivos no processo da desnitrificação.

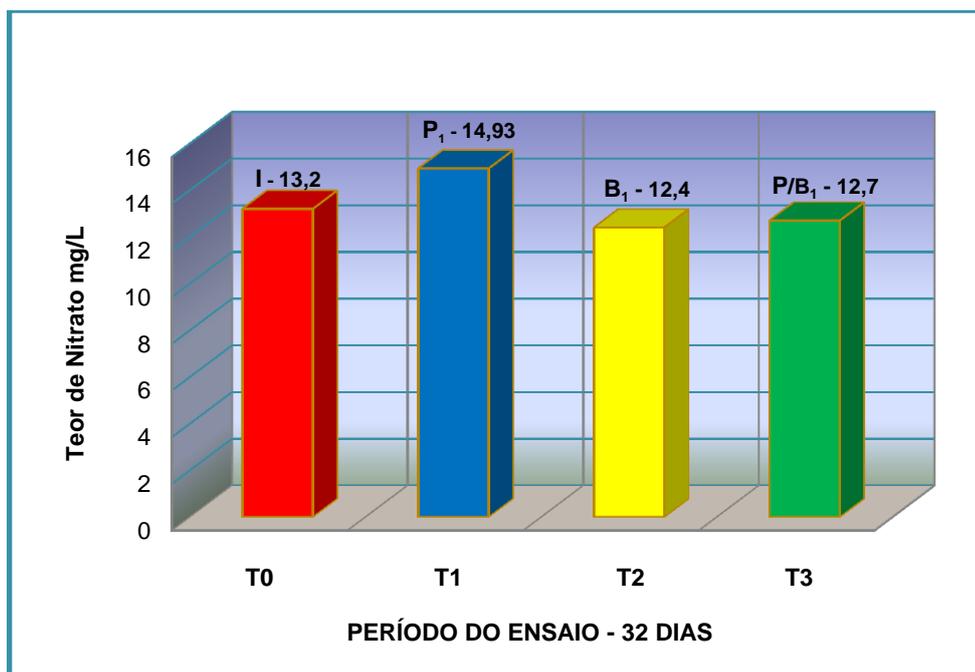
A manutenção de níveis elevados da concentração de nitrato pode estar associada à relação carbono e nitrogênio (C/N), que deve ser ajustada e padronizada. Quando essa relação é baixa, há um acúmulo de nitrato, nitrito e óxidos de nitrogênio; por outro lado, uma alta relação (C/N), o nitrito ou nitrato podem ser reduzidos à amônia, havendo consumo preferencial desta em detrimento ao nitrato. Esse fato também pode ser recorrido para justificar a prevalência de altos teores de nitrato neste estudo, bem como o desempenho dos microrganismos na desnitrificação.

O pH tem um papel importante no processo de desnitrificação e, possivelmente a razão para o processo inibitório dos microrganismos possa ser explicado a partir deste parâmetro; na tabela 5, verificamos que o valor médio do pH situou-se próximo a neutralidade (pH 6,84). Sendo que a manutenção de valores de pH elevados, próximos a 8,0, é um requisito essencial para evitar a inibição dos microrganismos, pois em valores de pH menores que 7,0 haveria uma maior concentração de óxidos de nitrogênio, causando toxicidade aos microrganismos, em particular nas BRS.

Altas concentrações de nitrato no efluente tratado possivelmente desencadearam a competição entre as BRN e BRS por compostos doadores de elétrons. Essa biocompetitividade favoreceria o metabolismo das BRN, uma vez que a redução de nitrato permite um maior ganho energético por parte deste microrganismo, tornando-o mais competitivo por substratos; logo ele deveria atingir maiores taxas de crescimento. Porém essa preferência não se concretizou no presente ensaio.

Verificou-se que a desnitrificação foi discreta no presente estudo; tendo a concentração de nitrato permanecido elevada para quase todos os microrganismos. Já o processo de nitrificação foi facilitado pela anaerobiose proporcionada nos frascos e também pelo potencial redox eletropositivo do meio, situação que inviabiliza as BRS de reduzir também o sulfato.

Figura 10 – Variação do teor de Nitrato



Legenda: I – Efluente Tratado; P<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa*; B<sub>1</sub> – *Bacillus cereus*; P/B<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa* / *Bacillus cereus*.

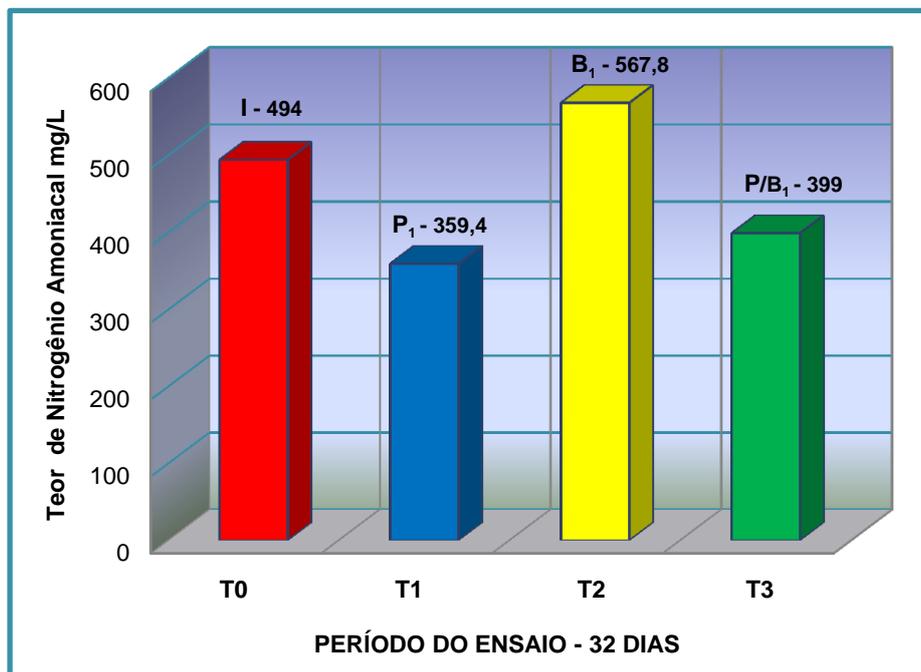
Autoria: sugestão do autor, 2011.

### 6.5.3 Nitrogênio Amoniacal

Conforme a Tabela 6 a maior parte do nitrogênio encontrado no efluente tratado se encontra sob a forma de nitrogênio amoniacal, corroborando com a ideia de que o ambiente anaeróbio dos aterros sanitários possui alta toxicidade capaz de inibir grupos bacterianos.

A variação da concentração de nitrogênio amoniacal Figura 11, embora reduzida pelos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* (P<sub>1</sub>) e consórcio, situou-se acima dos níveis estabelecido pela Resolução Conama 357/2005, cujo valor dos teores é calculado em função do pH. Entretanto o *Bacillus cereus* (B<sub>1</sub>) elevou a concentração de nitrogênio amoniacal durante o experimento muito além do valor do efluente tratado (inicial).

Figura 11 – Variação do teor de Nitrogênio Amoniacal



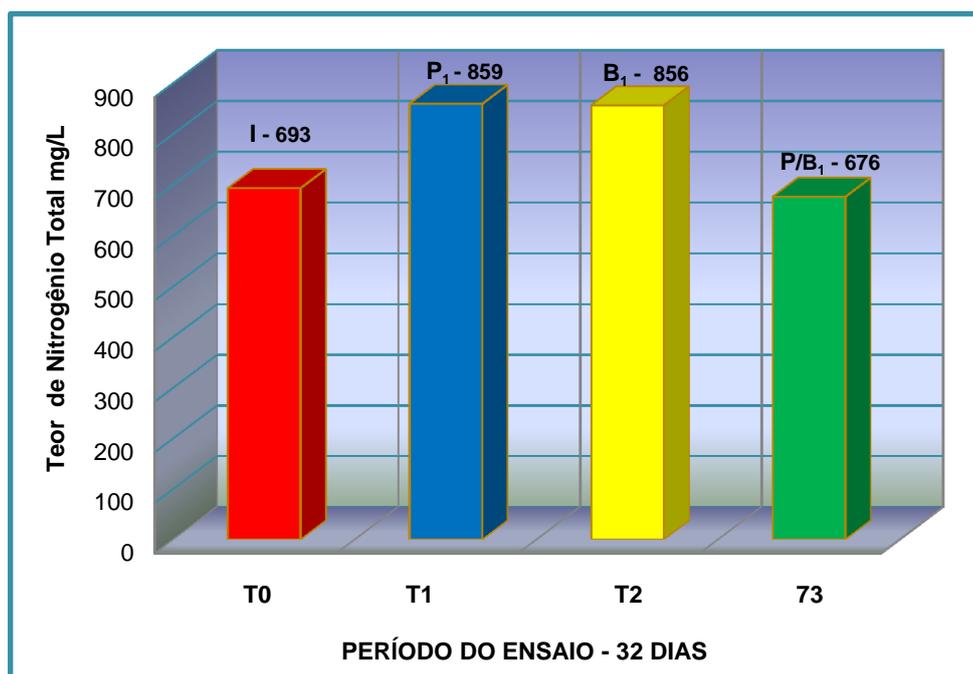
Legenda: I – Efluente Tratado; P<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa*; B<sub>1</sub> – *Bacillus Cereus* P/B<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa* / *Bacillus Cereus*.

Autoria: sugestão do autor, 2011.

#### 6.5.4 Nitrogênio Total

O nitrogênio total, formado pelo nitrogênio orgânico mais nitrogênio amoniacal, não apresentou uma redução significativa da concentração durante o experimento. Verificou-se que as culturas puras, *Pseudomonas aeruginosa* (P<sub>1</sub>) e *Bacillus cereus* (B<sub>1</sub>), não foram efetivos na redução desse parâmetro. Os valores da concentração aumentaram, ultrapassando o valor do efluente tratado (inicial). Foi possível notar que apenas o consórcio, *Pseudomonas aeruginosa*/*Bacillus cereus* (P/B<sub>1</sub>), atuou de modo redutor, porém reduzindo apenas de forma discreta os valores da concentração de nitrogênio total (Figura 12).

Figura 12 – Variação do teor de Nitrogênio Total



LEGENDA: I – Efluente Tratado; P<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa*; B<sub>1</sub> – *Bacillus Cereus* P/B<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa* / *Bacillus Cereus*.

Autoria: sugestão do autor, 2011.

### 6.5.5 Sulfato

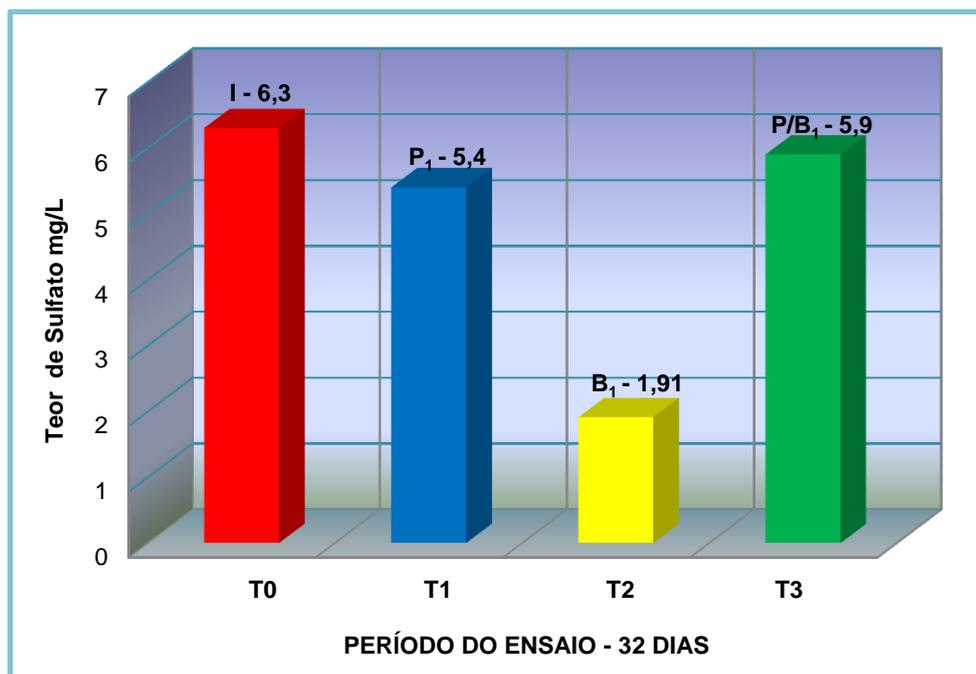
A redução do sulfato não ocorreu de forma uniforme em todo o experimento devido à redução desassimilativa do nitrato, a qual eleva a taxa de O<sub>2</sub> consumível no processo, além de elevar o valor da eletrocondutividade do meio para índices acima de + 100 mV, situação que impede o processo de dessulfatação por alguns grupos microbianos, fato observado neste experimento, isoladamente com o gênero *Bacillus*.

Na análise da Figura 13 se observou que todos os microrganismos foram promissores na redução da concentração de sulfato. O desempenho da *Pseudomonas aeruginosa* (P<sub>1</sub>) foi superior ao consórcio e, finalmente, o *Bacillus cereus* (B<sub>1</sub>) microrganismos que apresentou valores expressivos na redução da concentração de sulfato, sendo a alteração mais significativa mostrada durante todo o experimento.

De acordo com Oliveira *et al.* (2010) o processo de dessulfatação ou sulfetogênese se houver a presença de sulfato disponível para o bioprocesso, compostos como o sulfeto ou mesmo o enxofre elementar, passarão a ser utilizados

por BRS, as quais competirão direta ou indiretamente com as bactérias fermentativas acidogênicas, seguidas pelas acetogênicas e por último as metanogênicas. Nesta sequência, as primeiras iniciam num estado oxi-redução menos negativo e segue até a metanogênese, que ocorre em um estado oxi-redução mais negativo, em baixíssimas concentrações de O<sub>2</sub> dissolvido, que nos processos anteriores.

Figura 13 – Variação do teor de Sulfato



LEGENDA: I – Efluente Tratado; P<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa*; B<sub>1</sub> – *Bacillus cereus* P/B<sub>1</sub> – *Pseudomonas aeruginosa* / *Bacillus cereus*.  
Autoria: sugestão do autor, 2011.

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo comprovou a viabilidade da aplicação de microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, na forma isolada ou consorciada, em processos de biorremediação e sua possibilidade em reduzir teores de nitrato, fosfato, sulfato e/ou nitrogênio total em percolados parcialmente tratados provenientes de aterros sanitários.

Constatou-se a necessidade de certas condições de ajustes no experimento, por exemplo, o efluente bruto foi parcialmente tratado e suplementado com fonte de carbono, porque os microrganismos inoculados não foram capazes de atingir a fase de crescimento utilizando apenas a concentração original de matéria orgânica presente no efluente bruto. Houve a necessidade de aceptores alternativos de elétrons, uma vez que se trata de processo anaeróbico.

As Figuras 6A, 6B, 6C e 6D, relativa as fases de crescimento bacteriano, mostraram diferenças de tamanhos e morfologia das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, quando as mesmas se apresentam na forma isolada ou consorciada. Os tamanhos menores, presentes na forma consorciada, pode ser um indicativo de biocompetitividade.

A configuração da curva de crescimento bacteriano (Figura 7), não apresentou a fase estacionária, sendo a sua ausência possivelmente decorrente da escolha de intervalos de tempos demasiadamente longos, os quais tornaram impossível o monitoramento dessa fase.

Observou-se que a curva de crescimento bacteriano (fase log) Figura 7, atingiu valores maiores com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, seguida pela forma consorciada. No entanto, não houve correlação entre o crescimento bacteriano e a eficiência na redução da concentração dos parâmetros: citando como exemplo a *Pseudomonas aeruginosa*, foi o microrganismos com maior crescimento, no entanto mostrou um comportamento irregular durante o experimento.

O consórcio ocupou uma posição mediana na curva de crescimento, a exemplo da *Pseudomonas aeruginosa*, tampouco demonstrou equilíbrio entre o padrão de crescimento e a redução da concentração dos parâmetros analisados.

O *Bacillus cereus* foi o microrganismos que menos cresceu, no entanto, seu desempenho como sulfato redutor foi extraordinário. Por outro lado, em relação aos demais parâmetros, seus resultados não foram significativos.

As análises físico-químicas do efluente mostrou que os valores do pH se manteve neutro e dentro da faixa estabelecida pela Resolução Conama 357/2005 no ensaio.

Os valores do potencial redox (Eh) se mantiveram positivos durante todo o experimento, possivelmente em razão da redução desassimilativa do nitrato pelas BRN, que eleva os valores do Eh do meio. Entretanto este fator não inibiu a atividade das bactérias redutoras de sulfato, as quais necessitam de baixo potencial redox (-100 mV) para realizarem a redução desassimilativa do sulfato.

O ensaio foi conduzido em condições microaerófilas, baixa concentração de oxigênio, no entanto este fato não inviabilizou a atividades das BRS, ao contrário levantou a hipótese de que a redução do sulfato pelas BRS pode ocorrer em ambientes microaerófilos.

A concentração do oxigênio dissolvido (OD) mostrou uma variação em relação ao efluente tratado (Inicial), situando-se abaixo dos valores estabelecidos na Resolução Conama 357/2005, à exceção daqueles atribuídos as águas doces classe 4, cujo o valor da concentração de OD deve ser superior a 2 mg/L O<sub>2</sub>, porém a média final dos valores persistiu dentro dos limites para um processo aeróbio facultativo.

A Demanda Bioquímica de Oxigênio, embora tenha sido reduzida, não atingiu o valor de remoção mínima estabelecida pela Resolução Conama 430/2011, o qual é de 60%. Por outro lado, a relação DBO/DQO cresceu durante o experimento e o valor da média se aproximou de 1, o que pode ser interpretado como alta biodegradabilidade.

O ensaio também demonstrou que o parâmetro nitrato, apesar de estar presente em maior concentração no efluente tratado, comparado ao sulfato e tendo preferência na série de potenciais de oxidação como eletroceptores, conforme já relatado no item 2.2.2, não apresentou redução na sua concentração.

A justificativa para a manutenção de altas concentrações de nitrato no efluente preparado reforça a hipótese, de que o sulfato foi utilizado como acceptor final de elétrons para a oxidação da matéria orgânica no presente estudo.

Este fato é um indicativo para futuras tomadas de decisões, quando da utilização de microrganismos, em processos anaeróbios, para tratamento de efluentes em percolados de aterros sanitários.

A pesquisa deu subsídio para que novos experimentos sejam feitos com a finalidade de biotransformação dos líquidos percolados de aterros sanitários, bem como, base para novos estudos relativos às concentrações dos compostos como fósforo e nitrato.

### **7.1 Sugestões para estudos futuros**

O presente ensaio permitiu o manejo de apenas duas espécies bacterianas, na forma isolada e consorciada; considerando que a área estudada (universo amostral) é extensa em relação ao modelo simulado e, portando capaz de abrigar uma gama infinitamente maior de espécies. Sugerimos que em trabalhos futuros, se amplie o modelo ensaiado, com a identificação de todos os genes bacterianos existentes no percolado da Lagoa de Estabilização do Aterro Sanitário. Também que seja aumentado o número de espécies bacterianas em consórcio, a fim de que se possa compreender melhor as interações metabólicas existentes entre os microrganismos que compõem a micro fauna do sistema.

Ampliar o modelo ensaiado numa escala que permita a comparação dos testes de bateladas em biorreatores com o modelo real e a amplitude dos aterros sanitários.

É provável que a aplicação direta do bioprocessamento para o tratamento do efluente, não se obtenha um resultado satisfatório, portanto é necessário que esse tratamento seja precedido de tratamento físico-químico, como coadjuvante do processo.

## REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1984 NBR 8418/1984. Apresentação de projetos de aterros controlados e resíduos urbanos: Procedimento.
- ALBAGLI, Sarita. **Dimensão geopolítica da biodiversidade**. Rio de Janeiro: UFRJ/Programa de Pós-Graduação em Geografia, 1997 (tese de doutorado).
- ALCÂNTARA, P. B.; MONTEIRO, V. E. D.; PALHA, M. A. P.; ARAÚJO, J. M; JUCÁ, J.F. T. **Construção e monitoramento de uma célula de RSU em escala reduzida**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23, 2005, Campo Grande, MS. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. [S.l]: Academic Press, 1994. 302p.
- AMARAL, M. C. S.; FERREIRA, C. F. A.; LANGE, L. C.; AQUINO, S. F. de. Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de lixiviados de aterro sanitários. **Eng. Sanit. Ambient.**, vol.13, n.1:p. 38-45 . 2008.
- ANGELIDAKI, I., WENDY, S. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Technology**, vol.3, p.117-129. 2004.
- ANNA, L. M.M.S. **Produção de biosurfactantes do tipo raminoli pídio por *Pseudomonas sp.*** Rio de Janeiro, 2000 Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21th Edition. American Public Health Association, Washington, DC.2005.
- AQUINO, S.F e CHERNICHARO, C.A.L. **Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse**: causas e estratégias de controle. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 10, n. 2, 2005. p. 152-161.
- ARCHE, D.B. KIRSOP, B.H. The microbiology and control of anaerobic digestion. In: WHETLEY.A.(Ed.). **Anaerobic digestion: a waste treatment technology**, p.43-91, 1990.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT): **Resíduos Sólidos - Classificação**. NBR 10004. 2. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 71 p.
- ATLAS, R. M. E BARTHA, R. **Ecologia microbiana e microbiologia ambiental**. 3. Edição. Madri: Pearson Education S.A., 2002.
- BAIRD, C.2002. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman.

- BALBA, M.T; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and a field evaluation. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.32, 1998. p155-164.
- BLACK, J. G. (2002). **Microbiologia – Fundamentos e perspectivas**. 4. ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. **Appl.M icrobiol. Biotechnol.** 2000, 53, 495.
- BARBOSA, R. A.1988. **Tratamento anaeróbio de esgoto sanitário em reator de fluxo ascendente com leito de lodo**. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. 242p. Tese (Mestrado em Engenharia Química).
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by **Pseudomonas fluorescens isolated from a petroleum contaminated soil**. *Environment International*, n.26, pp.413-416, 2001.
- BARKER, J. F.; PATRICK, G.C.; MAJOR, D. **Natural attenuation of hydrocarbons in a shallow sand aquifer**. *Ground Water Monitoring Review*, Columbus, v.7,n.1,p.64-71, 1987.
- BARNES, D.; BLISS, P.J. **Biological control of nitrogen in wastewater treatment**. 1. Edição. Londres. E.& F. N. Spon, 1983.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.24 (Suppl.1), p.65-68, 2003.
- BEG, Q.K.; SAXENA, R.K.;GUPTA, R. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. **Process biochemistry**, Oxford, v.37, p.1103-1109, 2002.
- BIDONE, F. R. A. **Resíduos Sólidos Provenientes de Coletas Especiais: Eliminação e Valorização**. ABES, Porto Alegre, 2001.
- BIDONE, F. R. A. & POVINELLI, J. **Conceitos Básicos de Resíduos Sólidos**. São Carlos. EESC/USP, 1999.b, 120p.
- BITTON, G.; GERBA, C.P. **Ground water. Pollution Microbiology**. John Wiley & Sons. N.Y.377, p.1984.
- BITTON, G. **Wastewater microbiology**. New York:Ed.wiley, 2001
- BOGONOLO, G. **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons**. *Colloids and Surfaces*, n.152, pp.41-52,1999.
- BORDEN, R.C.; GOMEZ, C.A.; BECKER, M. T. **Geochemical indicators of intrinsic bioremediation**. *Ground water*, v.33 (2), p.180-189, 1995.

BØDTKER, G.; Lysnes, K.; Torsvik, T.; Bjørnstad, E. Ø.; Sunde, E.; J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 2006, 33, 454.

BROCK, E.; SCHMIDT, I.; STUVEN, R.; ZART, D. **Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor.** Arch Microbiol. Vol.163, p.16–20, 1995.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Biology of microorganisms.** 6. ed. New Jersey: Prentice – Hall, 1991.

CASTILHOS JÚNIOR, A. B.; LANGE, L. C.; GOMES, L. P.; PESSIN, N. (org.). **Resíduos sólidos urbanos: aterro sustentável para municípios de pequeno porte.** Rio de Janeiro: ABES / RiMa, 2003, 294 p.

CINTRA, I. S. **Estudo da influência da recirculação de chorume cru e chorume inoculado na aceleração do processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos.** Belo Horizonte: EE-UFMG, 2003. 457 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Resolução nº 357 de março de 2005. “Dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências”.

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em água subterrânea.** Dissertação (mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC – Florianópolis, SC, 2000.

CALLI, B. *et al.* **Methanogenic diversity in anaerobic bioreactors under extremely high ammonia levels.** Enzyme and Microbial Technology, v. 37, pp. 448-445. 2005

CHAPELLE, F.H. **Ground water microbiology & geochemistry** .N.Y. John Wiley & Sons Inc.424p.,1993.

CHERNICHARO, C. A. de L. **Reatores Anaeróbios.** Belo Horizonte. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Minas Gerais, 246 p. 1997.

CHEUNG, K.H.; GU, JI-DONG. **Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganism and bioremediation application potential: A review.** 59, 8-15. 2007.

CHU, I.M.; LEE, C.; LI, T.S. Production and degradation of alkaline protease in batch of *Bacillus subtilis* ATCC 1441. **Enzyme Microbial Technology** , New York, v,14, pp.755-761, 1992.

CLESCERI, L.S; GRENBORG, A.E; TRUSSEL, R.R. 1989. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 17 ed., apha.

COOKSON Jr., J.T. **Bioremediation Engineering** – Design and Application, MacGraw-Hill: EUA, 1995.

DANTAS, A. M. M.; LEITE, V. D.; PRASAD, S.; LOPES, W. S.; ATHAYDE JUNIOR, G. B.; SILVA, J. V. N. **Balço de massa de dco em reator anaeróbio de batelada tratando resíduos sólidos orgânicos**. In: VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 6, 2002, Vitória, ES. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2002.

DOLFING, J., BLOEMAN, W.G.B.M. **Activity measurements as tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments**. J. Microbiol. Methods, v.4, p.1-12. 1985.

ECCLES, H. **Removal of heavy metals from effluent streams – Why select a biological process?** International Biodeterioration & Biodegradation. 35, 5-16. 1995.

EL-FADEL, M.; BOU-ZEID, E.; CHAHINE, W. e ALAYLI, B., **Temporal variation of leachate quality from pre-sorted and baled municipal solid waste with high organic moisture content**. Waste Management 22, pp.269-282. Elsevier Science Ltda, 2002.

ELLOUZ, Y; BAYOUDH, A.; KAMMOUN, S. et al. Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and a viscera flour. **Bioresources Technology**, Amsterdam, v.80, p.49-51, 2001.

ENERGY Institute. **The stimulation of nitrate-reducing bacteria (NRB) in oilfield systems to control sulphate-reducing bacteria (SRB), microbiologically influenced corrosion (MIC) and reservoir an introductory review**. Energy Institute: London, 2003.

EPA – Environmental Protection Agency. Disponível em <<http://ww.epa.gov/mercury/>> Acessado em maio de 2010

FERREIRA, J. A. **Revisão sobre Técnicas de Tratamento de Chorume de Aterros Sanitários e relato de casos no Estado do Rio de Janeiro**, 2000.

FERREIRA, C.A.F. et al. Determinação da Fração da DQO Solúvel de Lixiviados de Aterro Sanitário Inerte à Processos Aeróbio e Anaeróbio: Parte I – Influência das Condições de Teste. **Revista Engenharia Sanitária**, submetido.

FIELD, J.; SIERRA, R.; LETTING, G. **Ensayos anaerobios**. IN: 4º SEMINARIO DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES SPAIN: VALLADOLID. 1998.

FONSECA, E. **Iniciação ao Estudo dos Resíduos Sólidos e da Limpeza Urbana**. Paraíba: Gráfica e Editora a União, 1999, 122p.

FORESTI, E. **Microbiologia da Digestão Anaeróbica**. São Paulo, 1999.

FURASTÉ, Pedro Augusto. **Normas Técnicas para o Trabalho Científico**. Explicação das Normas da ABNT. 16. ed.- Porto Alegre: s.n., 2012.

GADD, G. M.; **Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation**. Geoderma 122, 109-119, 2004.

GADD, G. M.; Biosorption. J. Chem. **Technol. Biotech.**, v.3, pp.302-304, 1992a.

GADD, G. M.; **Accumulation of metals by microorganism and algae**. In: Eehm, H. J. (ed.): Biotechnology – A comprehensive treatise. Weinheim: VHC Verlagsgesellschaft 6B. p 401-433, 1988.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M.M. **Surface-active compounds from microorganisms**. Biotechnology, v.10, p.60-65. 1992.

GESSESSE, A.; HATTI-KAUL, R.; GASHE, B.A. et al. Novel alkaline proteases from Alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, article in press, 2002.

GLAZER, A. N. ; Nikaido, H., **Microbial Biotechnology**: Fundamental of applied Microbiology, W. H. Freeman & Company: New York, 1995,p. 561

GOOGLE EARTH, 2010. Disponível em: <[www.google.com/intl/pt-PT/earth/index.html](http://www.google.com/intl/pt-PT/earth/index.html)>

GRADY.C.P.L. **Biodegradation**: its measurement and microbiological basis. Biotech Bioeng.,v.27,p.660-674, 1985.

GRANZIERA, M.L.M. **Direito de Águas**: Disciplina Jurídica das Águas Doces. Editora Atlas S.A. São Paulo, 2001.

GRUNDWELL, FK. **How do bacteria interact with minerals?** Hydrometallurgy 71(2003) 75-81.

GUWY, A.J. **Equipment used for testing anaerobic biodegradability and activity**. Reviews in Environmental Science and Technology, v.3,p.131-139. 2004.

HARPER, W. I.; Food Technol, 1974, 28, 50.

HARVEY, S.; ELASHVILI, I.; VALDES, J.J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, A.M. **Enhanced removal of EXXON Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant**. Bio/Technology, v.8, p. 228-230.1990.

HASHIMOTO A.G. **Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and production rate from straw**. Biol. Wastes v. 28, n.4, p.274-255. 1989.

HOMMEL, R.K.; HUSE, K. **Regulation of sophorose lipid production by *Candida apicola***. Biotechnology Letters, v.15, n.8, p.853-858. 1993.

IAMAMOTO, C. Y. **Remoção de nitrogênio de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal em reator contendo biomassa em suspensão operado em bateladas seqüenciais e sob aeração intermitente**. São Carlos: tese de doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos da USP, 2006.

JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.59, p.171-200, 1995.

JANSSEN, A. J. H.; MEIJER, S.; BONTSEMA, J.; LETTINGA, G. **Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor**. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 60, N° 2, p.147-155, 1998.

JETTEN, M. S. M.; VAN DONGEN, L. G. J. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.. **The Combined Sharon/Anammox Process**. Stowa: Foundation for Applied Water Research. IWA Publishing. London. 2001.

JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; SCHALK, J.; VANDONGEN, U. G.J.M.; VAN DE GRAAF, A. A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.;VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J. G. **The anaerobic oxidation of ammonium**. FEMS Microbiology Reviews. Vol. 22, p.421-437, 1999.

JIH, D.G.; HUANG, J.S.; HSIEK, K.C. **Performance evaluation of nitrogenous heterocyclic compounds by acclimated activated sludge**. Process. Biochemistry, v. 70.s.1090-95; 2001.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G;R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus sp.* JB-99in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, Oxford, v; 37, p.139-144, 2001.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus sp* I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, Oxford, v.40, n. 3-4, p.1263-1270, 2005.

JUNQUEIRA, F. F. **Análise do Comportamento de Resíduos Urbanos e Sistemas Drenos Filtrantes em Diferentes Escalas, com Referencia ao Aterro Sanitário do Jóquei Clube – DF**. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília. 2000

KAMPSCHREUR, M.J.; TAN, N.C.G.; PICIOREANU, C.; JETTEN, M.S.M.; SCHMIDT, I.;VAN LOOSDRECHT , M.C.M.. **Role of nitrogen oxides in the metabolism of ammonia-oxidizing bacteria**; The 11th Nitrogen Cycle Meeting 2005.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE.E. ;O. ;LEE, J .D.;LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactats from *Nocardia* SP.L-417. **Biotechnology Applied biochemistry**, n. 31, p. 249-253, 2000.

KRISHNA, K.R.; PHILIP, L. Bioremediation of Cr (VI) in contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**. B12, 1 109-117. 2005.

LEMOS, J. L. S. E SANTOS, R.L.C. **Aplicação de microorganismos na recuperação de metais**. Anais de I Jornada do Programa de Capacitação Interna CETEM, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

LENS, P.N.L.; VISSER, A.; JANSEN, A.J.H.; HULSHOFFPOL, L.W.; LETTINGA, G. **Biotechnological treatment of organic sulphate-rich wastewater**. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. V.28, n.1, p.41-88, 1998.

LI, B; IRVIN, S. **The comparison of alkalinity and ORP as indicators for nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor (SBR)**. *Biochemical Engineering Journal*. 34, 248-255. 2007.

LIBANIO, P. A. C. **Avaliação da eficiência e aplicabilidade de um sistema integrado de tratamento de resíduos sólidos urbanos e de chorume**. 2002. 156 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LIMA, A. C. F.; GONÇALVES, M. M. M.; GRANATO, M.; LEITE, S. G. F., 2001. **Anaerobic sulphate-reducing microbial process using UASB reactor for heavy metals decontamination**. *Environmental Technology*, 22, 261-270.

LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. Campinas, 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAXWELL, S. et al., **The Simulation of nitrate-reducing bacteria (NRB) in oil field systems to the control sulphate-reducing bacteria (SRB), microbiologically influenced corrosion (MIC) and reservoir souring**. An introduction review. Energy Institute, LONDON, 2003.

MONTEIRO, V. E. D. ; MELO, M. C.; ALCÂNTARA, P. B.; ARAÚJO, J. M.; ALVES, I. R. F. S.; JUCÁ, J. F. T. **Estudo do comportamento de RSU em uma célula experimental e suas correlações com aspectos microbiológicos, físicos e químicos**. 2006, pp 223-230. Artigo Técnico In: *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*. V.II. nº 03 - jul/set.

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.

MEURER, E. J. **Fundamento da Química do Solo**. 3. ed. Porto Alegre. 2008

METCALF & EDDY Inc. 3. ed. ISBN 0-7-100824-1. McGraw-Hill, EUA; (1991).

MOHAN, S. V.; RAO, N. C.; PRASAD, K. K.; SARMA, P. N., **Process Biochem**. 2005, 40, 2849.

MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, T.; IMANAKA, T. **A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arrobacter sp.*** *Journal of Bacteriology*, n.175, p.6459-6466, 1993.

- NASCIMENTO FILHO, Irajá do. **Estudo de Compostos Orgânicos em Lixiviados de Aterros Sanitários**. Tese de Doutorado, Programa de Pós- Graduação em Química. Universidade Federal do Rio – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.
- NEMAT, M.; JENNEMAN, G. E.; VOORDOUW, G., **Mechanistic study of Microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs**. *Biotechnology and Bioengineering*. V.74,n.5,p.424-434,2001.
- NIES, D.H.; SILVER, S. **Ion efflux system involved in bacterial metal resistances**. *J.Ind.Microbiol.*, v.14, p.186-199, 1995.
- OLIVEIRA, L. L.; OKADA, D.Y.; VARESCHE, M. B. A. **Anaerobic degradation of linear alkylbenzens sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials**. *Bio-resource Technology*, 10, p.5/12-22, 2010.
- OLIVEIRA, M. **Espionando: As Bactérias**. Disponível em:< <http://www.Inviv.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=6>>. Acesso em: 05 jan. 2012.
- PALEJWALA, S.; DESAI.J.D. **Production of an extracellular, emulsifier by a Gram-negative bacterium**. *Biotechnology Letters*, v.11, n.2, p.115 -118.1989.
- PATOCZKA, J.; PULLIAM, G.W. **Determination of toxicity thereshols of industrial Wastestreams to activated sludge process using fed batch reactor**. In..Purdue Industrial Waste Conference, 44 Chelsea, 1989. **Proccedings**. Michigan, Ann Abor Science, p.51-59, 1989.
- PEREIRA NETO, J. T. **Gerenciamento do lixo urbano: aspectos técnicos**. Ed. UFV, 129p. 2007.
- POHLAND, F.G.; HARPER, S.R.; CHANG, K.C.; DERTIEN, J.T. and CHIAN, E.S.K. (1985). **Leachate generation and control at landfill disposal sites**. *Water Poll. Res. J. Canadá*. v.20, n°3, p.10-24.
- POHLAND, F.G. and HARPER, S.R. (1986). **Critical review and summary of leachate and gas production from landfills**. U.S. Environmental Protection Agency Report N°EPA/600/2-86/073, U.S.A. EPA, Cincinnati, OH 45268.
- POSTGATE, J. R.; **The Sulphate-Reducing Bacteria**. University Press: Cambridge, 1984.
- REBOUÇAS, A.C. **As Águas Subterrâneas**. In *Águas Doces no Brasil*. Seminário Internacional Sobre Tecnologias de Remediação de Áreas Contaminadas, CETESB, nov.2002.
- REINSEL, M.A.; SEARS, J.T.; STEWART, P.S.; MCINERNEY, M.J. Control of microbial souring by nitrate, nitrite or glutaraldehyde injection in a sandstone column. **Journal of Industrial Microbiology**.v.17,9.128-136, 1996.
- RIEGEL, R.E. **Bioquímica**. 3. ed. São Leopoldo. Ed. UNISINOS, 2002.

VILAR *et al.* (1996) **Investigação Geotécnica em Aterros Sanitários**. Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, Porto Alegre - RS.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E. ; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. **Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1**. Fermentation and Bioindustrial CBEM, v.42, n1. 1991.

ROEST, K.; HELIG, H. G. H. J.; SMIDT, H.; VOS, W. M.; STAMS, A. J. M.; AKKERMANS, A. D. L. **Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill waste water**. *Systematic and applied microbiology*, v.28, 175-185, 2005.

ROMERO, F.J.; GARCIA, L.A.; SALAS, J.A.; DIAZ, M.; QUIRÓS, L.M. **Produção, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey**. *Process Biochemistry*, v.36, p.507-515.

ROZS, M.; MANCCZINGER, C.; VÁGVÖLGYI, F. et al. Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus linheniformis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.205, p.221-224, 2001.

ROZZI, A., REMIGI, E. **Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review**. *Reviews in Environmental Science and Technology*, v.3, p.93-115. 2004.

SANTOS, A.F.M.S; KATO, M.T; FLORENCIO, L. **Estudo comparativo entre a biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia de chorume de aterro controlado**. In: XI SILUBESA, Rio Grande do Norte – Brasil. 2004.

SCHMIDELL, W.; REGINATTO, V.S. **Remoção de nitrogênio**. In: Tratamento biológico de águas residuárias. Paper Prist. 1. ed. Florianopolis, 2007.

SCHIPPERS, A. **Microrganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification**. In: DONATI, E.R.; SAND, W. *Microbial processing of metal sulfides*. La Plata: Springer, Cap.1, p.3-33, 2007.

SHARMA, A; SAHGAL, M; JOHRI, B. N. **Microbial Communication in the rhizosphere: operation quorum sensing**. *Current Science*, v.85. n.8, 2003.

SILVA, A. S. **Otimização do Cultivo de Linhagens Industriais de *Bacillus Cereus* SP. Em Diferentes Meios de Cultura**. 115 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SILVA, C. H. P. **Bacteriologia**: um texto ilustrado. Rio de Janeiro: Eventos, 1999, 531p.

SIMONETI, M. F. **Inativação térmica de ovos de helmintos em água e biossólidos digeridos**. 2006. 251p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

SIMÕES, G. F. **modelo para Avaliação de Recalques em aterros e disposição de resíduos sólidos urbanos**. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 2000.

SING, P & CAMEOTRA, S.S. **Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactant**. Biochemical and biofysical research communication. V. 319.2004

SISINNO, C.L.S. (org.). **Resíduos sólidos, ambiente saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz.2000, 142p.

SMAYADA, T. **The influence of line and biological activity on sediment pH, redox and phosphorus dynamics**. Hydrobiology, 192:191-2003.1990.

SMITH, R.W. and MISHA. M. Recent developments in the bioprocessing of mineral. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, 12, p.37, 1993.

SPERLING. M. V. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed., DESA-UFMG: Belo Horizonte, 1998, cap.4.

SPROCATI, A.R; ALISI,C; SEGRE,L;TASSO,F; GALETTI,M. e CREMISINI,C. **Investigating heavy metals resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine**. Science of the Total Environment, 366, p.649-658, 2006.

STANIER, R.Y; PALLERONI, N.J; DOUDOROF, F. M., The aerobic *Pseudomonas*: a) Taxonomic Study. **Journal General of Microbiology**, v43, n.2, p.159-271, 1966.

STUBNER, S. Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S RNA gene-targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**.Vol.57, p.219– 230, 2004.

STURMAN, P. J.; GOERES, D. M. **Control of hydrogen sulfide in oil and gas wells with nitrite injection**. In..SPE ANNUAL TECHNICAL CONFERENCE AND EXHIBITION, 1999, Huston. Proceedings...Richardson..Society of Petroleum Engineers, 1999.paper SPE 566772.

STURMAN, P.J. **Solving the oilfield souring puzzle**. Control of downhole hydrogen sulphide production using nitrite. In:UKCORROSION 2001,Sheffiel. Proceedings..., 2001. paper19.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAKER, L. W. **Bacteriocins of Gram-positive bacteria**. Bacteriology reviews, Baltimore, v.40, p.722-756. 1976.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 73-94, 2009.

TCHOBANOGLIOUS, G. **Wastewater engineering**: Treatment, disposal and reuse.

TORTORA, G. J.; BERDEL, R.; Funke e Christine L. Case. **Microbiologia Geral**. Artmed, Porto Alegre. 2000.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: ATHENEU, 2008.760p.

VAILATI, J. **Agricultura Alternativa e comercialização de produtos naturais**. IBD -Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Rural, Botucatu. São Paulo, 1998.

VAN HAANDEL, A. C.; ALEM SOBRINHO, P. (2006). Produção, composição e constituição de esgoto. In: **Biossólidos – Alternativa de Uso de Resíduos de Saneamento**. Rio de Janeiro: ABES, 2006. 417p.

VANOTTI, M. B. and HUNT, P. G. Nitrification treatment of swine wastewater with acclimated nitrifying sludge immobilized in polymer pellets. Transaction of ASAE, v.43, n.2, p.405-413, 2000

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Rio de Janeiro. ABES, 2002. 243p.

VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Redução da Produção de H<sub>2</sub>S em Sistemas.

WATLING, H.R The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review. Hydrometallurgy, v.84, p.81 – 108, 2006

WANG , Z. & BANKS, C.J. **Treatment of a high-strength sulphate-rich alkaline leachate using an anaerobic filter**. Waste Management. Vol. 27, p.359–366, 2007.

WEIJMA, J. ;BOTS, E.A.A. ;TANDDLINGER, G. ;STAMS, A.J.M. ;HULSHOFF; POL, L.W.; LETTINGA, G., Water Res.2002,.36, 1825.

ZAGURY, G. J.; KULNIEKS, V. I.; NECULITA, C. M. **Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment**. Chemosphere. Vol. 64, p.944–954, 2006.

< [www.canoas.rs.gov.br](http://www.canoas.rs.gov.br) > Acesso em 13 fev. 2011 ou 04 ago. 2011.

**ANEXO A - MEIOS DE CULTURA e REAGENTES**

## Caldo de Enriquecimento

Extrato de carne .....	0,3 g
Peptona .....	1,0 g
Cloreto de sódio .....	0,5 g
Água destilada.....	100,0 ml

## Água peptonada tamponada

Peptona .....	10 g
Cloreto de sódio .....	5 g
Fosfato de sódio dibásico.....	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico.....	1,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Suspender e dissolver os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 3000 ml em frascos Erlenmeyers de 5 L ou frasco similar. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. pH final:  $7,2 \pm 0,2$  a 25°C.

Nota: O meio pronto deve ser estocado a temperatura de 15 a 30°C. Para o preparo a partir do meio desidratado, obedecer às recomendações do fabricante.

## Solução salina a 0,85%

Cloreto de sódio .....	8,5g
Água destilada.....	1000 mL

Dissolver o cloreto de sódio em água. Autoclavar a 121°C / 15 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.

## Ágar Lisina Ferro

Peptona .....	5,0g
Extrato de levedura .....	3,0g
Glicose .....	1,0g
L-Lisina.....	10,0g
L-arginina .....	10g
Citrato férrico amoniacal .....	0,5g
Tiosulfato de sódio .....	0,04g
Púrpura de bromocresol.....	0,02g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000 mL

## Agar xilose lisina desoxicolato

Extrato de levedura .....	3 g
L-lisina .....	5 g
Xilose .....	3,75 g
Lactose.....	7,5 g
Sacarose .....	7,5 g
Desoxicolato de sódio .....	2,5 g
Citrato férrico amoniacal .....	0,8 g
Cloreto de sódio .....	5 g
Tiosulfato de sódio .....	6,8 g
Vermelho de fenol .....	0,08 g

Ágar..... 15 g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende os componentes em água destilada e dissolve por aquecimento com agitação até a ebulição. Evitar o aquecimento excessivo. Não autoclavar. Distribuir alíquotas de aproximadamente 20 mL em placas de Petri. pH final:  $7,4 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .  
 A.6

#### Água peptonada tamponada (APT)

Peptona..... 10 g  
 Cloreto de sódio ..... 5 g  
 Fosfato de sódio dibásico..... 3,5 g  
 Fosfato de potássio monobásico..... 1,5 g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende e dissolve os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL e alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio. 16 x 160 mm. Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. pH final:  $7,2 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Nota:

O meio pronto deve ser estocado em temperatura de 15 a  $30^{\circ}\text{C}$ .

#### Caldo uréia

Extrato de levedura ..... 0,1g  
 Fosfato dibásico de sódio..... 9,5g  
 Fosfato monobásico de potássio..... 9,1g  
 Ureia bacteriológica..... 20,0g  
 Vermelho de fenol ..... 0,01g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende os ingredientes em água destilada e homogeneizar até a total dissolução. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 3 mL em tubos de ensaio 13 x 100 mm. pH final  $6,8 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### Caldo tetracionato

Polipeptona ..... 5 g  
 Sais biliares ..... 1 g  
 Carbonato de cálcio ..... 10 g  
 Tiosulfato de sódio (pentahidratado) ..... 30 g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende os componentes em água destilada e dissolve por aquecimento até a ebulição. Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio 16 x 160 mm estéreis. Não autoclavar. Estocar por até duas semanas a  $5-10^{\circ}\text{C}$ . pH final  $8,4 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . No momento da utilização do meio adicionar para cada 10 mL de caldo tetracionato 0,2 mL de solução de iodo-iodeto de potássio e 0,1 mL de solução de verde brilhante a 0,1%.

O meio não deverá ser estocado após o acréscimo das soluções descritas acima.

#### Água peptonada tamponada

Peptona..... 10 g  
 Cloreto de sódio ..... 5 g  
 Fosfato de sódio dibásico..... 3,5 g

Fosfato de potássio monobásico..... 1,5 g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende e dissolve os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 3000 mL em frascos Erlenmeyers de 5 L ou frasco similar. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C.

Nota:

O meio pronto deve ser estocado a temperatura de 15 a 30°C. Para o preparo a partir do meio desidratado, obedecer às recomendações do fabricante.

Solução salina a 0,85%

Cloreto de sódio ..... 8,5g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Dissolver o cloreto de sódio em água. Autoclavar a 121°C / 15 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.

Ágar Lisina Ferro

Peptona..... 5,0g  
 Extrato de levedura ..... 3,0g  
 Glicose ..... 1,0g  
 L-Lisina..... 10,0g  
 L-arginina ..... 10g  
 Citrato férrico amoniacal ..... 0,5g  
 Tioissulfato de sódio ..... 0,04g  
 Púrpura de bromocresol ..... 0,02g  
 Ágar..... 15,0g  
 Água destilada..... 1000 mL

Agar xilose lisina desoxicolato

Extrato de levedura ..... 3 g  
 L-lisina ..... 5 g  
 Xilose ..... 3,75 g  
 Lactose..... 7,5 g  
 Sacarose ..... 7,5 g  
 Desoxicolato de sódio ..... 2,5 g  
 Citrato férrico amoniacal ..... 0,8 g  
 Cloreto de sódio ..... 5 g  
 Tioissulfato de sódio ..... 6,8 g  
 Vermelho de fenol ..... 0,08 g  
 Ágar..... 15 g  
 Água destilada..... 1000 mL

Suspende os componentes em água destilada e dissolve por aquecimento com agitação até a ebulição. Evitar o aquecimento excessivo. Não autoclavar. Distribuir alíquotas de aproximadamente 20 mL em placas de Petri. pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C.  
 A.6

Água peptonada tamponada (APT)

Peptona..... 10 g  
 Cloreto de sódio ..... 5 g  
 Fosfato de sódio dibásico..... 3,5 g  
 Fosfato de potássio monobásico..... 1,5 g

Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende e dissolve os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL e alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio. 16 x 160 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. pH final:  $7,2 \pm 0,2$  a 25°C.

Nota:

O meio pronto deve ser estocado em temperatura de 15 a 30°C.

#### Caldo ureia

Extrato de levedura ..... 0,1g  
 Fosfato dibásico de sódio..... 9,5g  
 Fosfato monobásico de potássio..... 9,1g  
 Uréia bacteriológica..... 20,0g  
 Vermelho de fenol ..... 0,01g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende os ingredientes em água destilada e homogeneizar até a total dissolução. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 3 mL em tubos de ensaio 13 x 100 mm. pH final  $6,8 \pm 0,2$  a 25°C.

#### Caldo tetracionato

Polipeptona ..... 5 g  
 Sais biliares ..... 1 g  
 Carbonato de cálcio ..... 10 g  
 Tiosulfato de sódio (pentahidratado) ..... 30 g  
 Água destilada..... 1000 mL  
 Suspende os componentes em água destilada e dissolve por aquecimento até a ebulição. Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio 16 x 160 mm estéreis. Não autoclavar. Estocar por até duas semanas a 5-10°C. pH final  $8,4 \pm 0,2$  a 25°C. No momento da utilização do meio adicionar para cada 10 mL de caldo tetracionato 0,2 mL de solução de iodo-iodeto de potássio e 0,1 mL de solução de verde brilhante a 0,1%.

O meio não deverá ser estocado após o acréscimo das soluções descritas acima.