

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

BRUNA DURAT COELHO

**TRATAMENTO DE EFLUENTE KRAFT POR BIOAUMENTAÇÃO COM
BACTÉRIA AUTOCTONE IMOBILIZADA EM MEIO SUPORTE ESPONJOSO**

CURITIBA

2023

BRUNA DURAT COELHO

**TRATAMENTO DE EFLUENTE KRAFT POR BIOAUMENTAÇÃO COM
BACTÉRIA AUTOCTONE IMOBILIZADA EM MEIO SUPORTE ESPONJOSO**

TREATMENT OF KRAFT EFFLUENT BY BIOAUGMENTATION WITH AUTOCHTONE
BACTERIUM IMMOBILIZED ON SPONGY SUPPORT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Tratamentos de Águas de Abastecimento e Residuárias.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Regina Xavier

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto

CURITIBA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba



BRUNA DURAT COELHO

**TRATAMENTO DE EFLUENTE KRAFT POR BIOAUMENTAÇÃO COM BACTÉRIA AUTOCTONE
IMOBILIZADA EM MEIO SUPORTE ESPONJOSO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Data de aprovação: 24 de Abril de 2023

Dra. Claudia Regina Xavier, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Giselle Maria Maciel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Gustavo Henrique Couto, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Victor Leandro Campos Araneda, Doutorado - Universidad de Concepción - Udec

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/04/2023.

RESUMO

O Brasil é considerado referência mundial na produção de papel, setor que contribui com estimados 46,5% do produto interno bruto nacional. Extensiva produção, que acarreta no uso exaustivo de água, matérias-primas, energia e produtos químicos, conseqüentemente originando efluentes historicamente apontados como poluídos, devido a presença de elevadas concentrações de matéria orgânica e compostos recalcitrantes que induzem cor e ecotoxicidade ao mesmo, o configurando como preocupante ameaça à saúde e ao ambiente. Estratégias para o tratamento de águas residuárias da indústria papelreira tem sido estudadas, como a bioaugmentação com bactérias, devido potencial metabolismo adaptado destas as condições adversas do ambiente. Quando utilizadas em conjunto a técnicas de imobilização, proporcionam que o inóculo da bactéria nativa, denominada de autóctone, se desenvolva sob a forma de biofilmes na superfície de um meio suporte que proporciona maiores superfícies para adesão e crescimento da população bacteriana.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o tratamento de efluente de celulose kraft por bioaugmentação com bactéria autóctone *Advenella kashmirensis*. Foi realizado o tratamento de efluente de indústria de celulose kraft por lagoas aerada em escala de bancada. A pesquisa foi dividida em fase I, em que se investigou o tratamento do efluente a partir da adição de unidades de meio suporte do tipo aquaporousgel (APG) sem a presença da bactéria imobilizada. A fase II, na que se avaliou o desempenho do biofilme da bactéria autóctone imobilizada em meio suporte APG. A fase III, onde foi avaliado o potencial de tratamento da *A. kashmirensis* sob a forma de vida planctônica adicionada diretamente ao efluente da lagoa. O desempenho do inóculo e do meio APG foram avaliados pelos parâmetros remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), demanda química de oxigênio (DQO), carbono orgânico total (COT), cor, compostos fenólicos totais (CFT), compostos lignínicos (CL) e área espectral. Os tratamentos realizados na presença do meio suporte livre (fase I) ou contendo bactérias imobilizadas nesses (fase II), foram eficientes no tratamento dos parâmetros físico-químicos analisados. Destacando ainda que a presença da bactérias imobilizadas teve uma remoção superior para os CFT e os CL, também observadas pela análise da área espectral, com remoção de aproximadamente 30% de compostos absorvedores no UV-Vis contidos no efluente. A fase II e III em que havia o inóculo da bactéria, apresentou potencial de remoção de compostos recalcitrantes, chegando a remover 8% da cor do efluente. Associado a estes resultados, foram observadas as micrografias eletrônicas das esponjas APG utilizadas no ensaio de imobilização e daquelas adicionadas a lagoa nas fase I e II da pesquisa. As imagens possibilitaram a investigação do crescimento de biofilme, sendo constatado a adesão à matriz interior do APG. Assim, foi possível imobilizar a bactéria autóctone *A. kashmirensis* no meio suporte esponjoso e este produto foi eficaz no tratamento de efluente de celulose kraft, atingindo remoções de contaminantes superiores aqueles na ausência da bactéria.

Palavras-chave: Bactéria autóctone; Biofilme; Meio suporte; Resazurina; Tratamento secundário.

ABSTRACT

Brazil is considered a world reference in paper production, a sector that contributes with estimates of 46.5% of the national gross domestic product. Extensive production, which entails the exhaustive use of water, raw materials, energy and chemicals, consequently originating effluents historically identified as polluted, due to the presence of high concentrations of organic matter and recalcitrant compounds that induce color and ecotoxicity to it, configuring it as a concern for health and the environment. Strategies for the treatment of wastewater from the paper industry have been studied, such as bioaugmentation with bacteria, due to the potential metabolism adapted to these adverse environmental conditions. When used in conjunction with immobilization techniques, providing that the inoculum of native bacteria, called autochthonous, develops in the form of biofilms on the surface of a support medium that provides greater surfaces for adhesion and growth of the bacterial population.

Thus, the objective of this work was to evaluate the treatment of kraft pulp effluent by bioaugmentation with the autochthonous bacteria *Advenella kashmirensis*. The treatment of effluent from the kraft pulp industry was carried out using aerated lagoons on a bench scale. The research was divided into phase I, in which the treatment of the effluent was investigated from the addition of support medium units of the aquaporousgel (APG) type without the presence of immobilized bacteria. Phase II, in which the performance of the biofilm of the autochthonous bacteria immobilized on the APG support medium is evaluated. Phase III, where the treatment potential of *A. kashmirensis* was evaluated in the form of planktonic life applied directly to the effluent of the lagoon. The performance of the inoculum and the APG medium was evaluated by the parameters removal of biochemical oxygen demand (BOD₅), chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), color, total phenolic compounds (CFT), ligninic compounds (CL) and spectral area. The treatments carried out in the presence of the free support medium (phase I) or containing the immobilized preparations (phase II), were efficient in the treatment of the physical-chemical parameters analyzed. Also highlighting that the presence of immobilized bacteria had a higher removal for CFT and CL, also observed by the analysis of the spectral area, with removal of approximately 30% of UV-Vis absorbing compounds contained in the effluent. Phases II and III, in which the bacteria were inoculum, showed the potential to remove recalcitrant compounds, removing 8% of the effluent color. Associated with these results, electronic micrographs of the APG sponges used in the immobilization test and others added to the pond in phase I and II of the research were observed. The images made it possible to investigate the growth of the biofilm, confirming adherence to the interior matrix of the APG. Thus, it was possible to immobilize the autochthonous bacteria *A. kashmirensis* in the spongy support medium and this product was effective in the treatment of kraft cellulose effluent, achieving higher contaminant removals than those in the absence of the bacteria.

Keywords: Autochthonous bacteria; Biofilm; Carriers; Resazurin; Secondary treatment.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eficiências obtidas no tratamento de efluente de celulose e papel em Lagoa Aerada.	12
Tabela 2. Eficiências de tratamentos de efluentes com aplicação de meios de suporte	14
Tabela 3. Caracterizações do efluente e da bactéria autóctone.....	19
Tabela 4. Características das amostras de afluente	28
Tabela 5. Perfis de Imobilização de <i>A. kashmirensis</i> em APG	29
Tabela 6. Resultados de Eh das fases experimentais do estudo.....	35
Tabela 7. Análise estatística dos tratamentos.....	46
Tabela 8. Análise comparativa de eficiências de tratamento	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Percentual dos principais consumidores da celulose e papel exportados do Brasil...	9
Figura 2. Meio suporte APG.....	17
Figura 3. Fluxograma das etapas da pesquisa	18
Figura 4. Fluxograma do esquema metodológico da determinação de sólidos aderidos	21
Figura 5. Esquema da Lagoa de bancada	22
Figura 6. Ensaio de imobilização bacteriana.....	24
Figura 7. Meio experimental de imobilização utilizado na fase II do experimento	25
Figura 8. Ensaio de viabilidade celular de <i>A. kashmirensis</i>	30
Figura 9. Atividade do biofilme de <i>A. kashmirensis</i> em função da emissão resurfina detectado em espectrometria de fluorescência.....	31
Figura 10. Determinação do biofilme ativo de <i>A. kashmirensis</i> em função da emissão resurfina detectado em leitora de microplacas	32
Figura 11. Parâmetros de controle de tratamento	33
Figura 12. Remoção de matéria orgânica em relação a DBO ₅	36
Figura 13. Remoção de matéria orgânica em relação a DQO	37
Figura 14. Remoção de matéria orgânica em relação ao COT.....	38
Figura 15. Níveis de remoção de Cor.....	39
Figura 16. Níveis de remoção de CFT.....	40
Figura 17. Níveis de remoção de CL.....	41
Figura 18. Níveis de remoção de área espectral (AE).....	42
Figura 19. Níveis de remoção de turbidez.....	43
Figura 20. Sólidos suspensos nas lagoas aeradas	44
Figura 21. Teores de Sólidos Aderidos.....	45
Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do meio de suporte APG antes do uso.....	48
Figura 23. Micrografia do meio de suporte APG da fase I.....	49
Figura 24. Micrografia do suporte APG com biofilme de <i>A. kashmirensis</i>	50
Figura 25. Micrografia do APG da fase II.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µm	Micrômetro
APG	AQUAPOROUSGEL®
APHA	American Public Health Association
C:N:P	Razão Carbono, Nitrogênio e Fósforo
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CL	Compostos Lignínicos
CMCM	Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais
COT	Carbono Orgânico Total
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETARs	Estações de Tratamento de Águas Residuais
LA	Lagoa Aerada
LAF	Lagoa Aerada Facultativa
LATAR	Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OD	Oxigênio Dissolvido
pH	Potencial Hidrogeniônico
PUF	Esponja de Poliuretano – do inglês <i>Polyurethane Foam</i>
SAF	Sólidos Aderidos Fixos
SAT	Sólidos Aderidos Totais
SAV	Sólidos Aderidos Voláteis
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UFC	Unidade Formadora de Colônias
VIS440nm	Comprimento de onda visível 440 nm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO	8
3. REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1 A indústria de celulose e papel	9
3.1.1 Produção de celulose	9
3.1.2. Geração de efluente de celulose	10
3. 1.3. Tratamento de efluente de celulose	11
3.2 Bioaumentação de bactérias aderidas em meio suporte	12
3.2.1. <i>Advenella kashmirensis</i>	15
3.2.2 Uso e características dos meio suportes	16
4. METODOLOGIA	18
4.1 Sequência experimental	18
4.2.1 Metodologias utilizadas	19
4.3 Sistema de tratamento LA – APG	21
4.4 Cultivo, formação de biofilme e ensaio de viabilidade de <i>Advenella kashmirensis</i>	23
4.4.1 Cultivo de <i>A. kashmirensis</i>	23
4.4.2 Investigação da atividade biológica do biofilme	25
4.5 Análises Estatísticas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Caracterização do Afluente bruto de celulose Kraft	28
5.2.1 Investigação do biofilme de <i>Advenella kashmirensis</i>	28
5.2.2 Investigação da viabilidade biológica de <i>Advenella kashmirensis</i>	29
5.3 Parâmetros de operação das LAs	32
5.4 Avaliação da eficiência de tratamento	36
5.4.1 Remoção de matéria orgânica	36
5.3.2 Remoção de compostos específicos, cor, área espectral e turbidez	38
5.4 Análise estatística da eficiência de tratamento	46
5.4.1 Análise comparativa das eficiências de tratamento	47
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

A indústria de celulose kraft tem um papel importante na economia. Estima-se que este produto é responsável por 90% do montante de celulose global manufaturada (DEL RIO, et al. 2022; PAZDA, 2022). Como efeito, a produção da celulose kraft demanda o extenso consumo de água que pode chegar de e 10 a 100 m³ por tonelada de celulose produzida, além de matérias-primas, energia e produtos químicos (RAJWAR; PALIWAL; RAI, 2017; PING; ZHUANG; SHAN, 2019; SONKAR, et al., 2021; PAZDA, 2022).

O efluente kraft é constituído por derivados da matéria-prima formados no processo de polpação, como a lignina residual e hemiceluloses, que o confere altos níveis de demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO₅), cor e ecotoxicidade (KUMAR et al., 2012; ASHRAFI; YERUSHALMI; HAGHIGHAT, 2015; CABRERA, 2017; LEWIS et al., 2018; PING; ZHUANG; SHAN, 2019; LIANG et al., 2020). Consequentemente sem o tratamento adequado, estão suscetíveis a impactar negativamente os corpos d'água receptores, o que constitui uma ameaça ao ambiente e a saúde humana nessas condições (ASHRAFI; YERUSHALMI; HAGHIGHAT, 2015; LEWIS et al., 2018; PING; ZHUANG; SHAN, 2019).

Na busca por alternativas econômicas, ecológicas e de eficiência energética para o tratamento de efluentes, diversas estratégias tem sido exploradas, como o tratamento biológico ou secundário, que utiliza a atividade microbiológica de fungos e bactérias por sua capacidade em converter compostos orgânicos tóxicos em produtos menos poluentes, entre eles CO₂ e H₂O (RAJ et al., 2014; BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015; LEWIS et al., 2018; LIANG et al., 2020).

Uma potencial metodologia para o tratamento de águas residuais corresponde a bioaugmentação, que consiste na seleção e adição de microrganismos eficientes para remoção de poluentes específicos do efluente (NUNES et al. 2021; VERDEL et al. 2021). Por esta razão estudos tem sido realizados para explorar a diversidade das fontes microbianas potencialmente capazes de degradar uma ampla gama de poluentes (RAJ et al., 2014; RAUT et al., 2018).

Alternativamente, nos últimos anos várias pesquisas tem sido realizadas com o objetivo de melhorar a eficácia do tratamento biológico da indústria papeleira, como o isolamento e identificação de microrganismos, em especial espécies bacterianas capazes de sobreviver e degradar efetivamente as substâncias recalcitrantes de efluentes industriais (KUMAR et al., 2012; RAJ et al., 2014; DUAN et al., 2016; CAI; LEI; LI, 2019; GHOLAMI et al., 2022).

Hipóteses apontam que bactérias autóctones em especial as nativas de habitats poluídos,

apresentam capacidade de desenvolver sistemas enzimáticos específicos que as permitem sobreviver a condições adversas do ambiente (KUMAR et al., 2012).

As bactérias podem crescer sob a forma de biofilmes aderidos a superfície interna de meios de suporte, que possibilitam sua sobrevivência, sendo um ambiente protetor frente a condições desfavoráveis como temperatura, pH, salinidade e variações de carga de efluentes (DINAMARCA et al., 2010; BARWAL; CHAUDHARY, 2014; BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015; BANERJEE et al., 2018).

Da mesma forma, o crescimento do biofilme bacteriano está relacionado as superfícies de adesão que dependem de características de porosidade, área específica, rugosidade e densidade do meio suporte utilizado, estes meios suporte devem possuir também baixo custo, resistência (DINAMARCA et al., 2010; PEITZ; XAVIER, 2019), resistência a abrasão e serem inertes ao ataque biológico (DINAMARCA et al., 2014; BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015). No mercado existem diferentes formas e tamanhos de suporte disponíveis (OLIVEIRA et al., 2012, BARWAL; CHAUDHARY, 2014). Dentre estes, o material esponjoso comercial AQUAPOROUSGEL® (APG), da empresa Japonesa Nisshinbo Chemical Inc. é indicado para imobilização de bactérias em biofilme devido à sua alta porosidade, natureza hidrofílica e estabilidade (PEITZ; XAVIER, 2019; SUBSANGUAN et al., 2020).

Neste contexto, visto que as águas residuárias das indústrias de celulose e papel correspondem a ambientes extremos, nos quais é possível encontrar microrganismos capazes de depurar compostos específicos desta matriz (LEWIS et al., 2018), o presente trabalho objetivou o tratamento de efluente de celulose kraft por bioaugmentação com bactéria autóctone *Advenella kashmirensis* imobilizada em meio suporte esponjoso. Sendo a pesquisa estruturada como potencial inovação para processo de tratamento, formalizada pela cooperação técnica (ACT nº 02/2021).

2. OBJETIVO

Avaliar o tratamento de efluente de celulose kraft por bioaugmentação com bactéria autóctone *Advenella kashmirensis* livre e imobilizada em meio suporte esponjoso.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar o potencial da espécie bacteriana autóctone para tratamento de parâmetros específicos e recalcitrantes do efluente de celulose kraft em processo de tratamento biológico, sobre a forma de biofilme e de vida livre.
- Construir e operar reator lagoa aerada em escala de bancada com adição de meio suporte esponjoso contendo bactérias imobilizadas ou planctônicas, e operando em relação de C:N:P - 100:0,5:0,1 e carga orgânica volumétrica de 0,2 kgDQO.m⁻³.d⁻¹.
- Avaliar o desempenho de remoção de DBO₅, DQO, COT, Cor, Compostos Fenólicos Totais e derivados da Lignina.
- Propor condições adequadas a tratabilidade do efluente kraft em lagoa aerada contendo bactéria imobilizada em meio suporte esponjoso, para remoção de compostos específicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

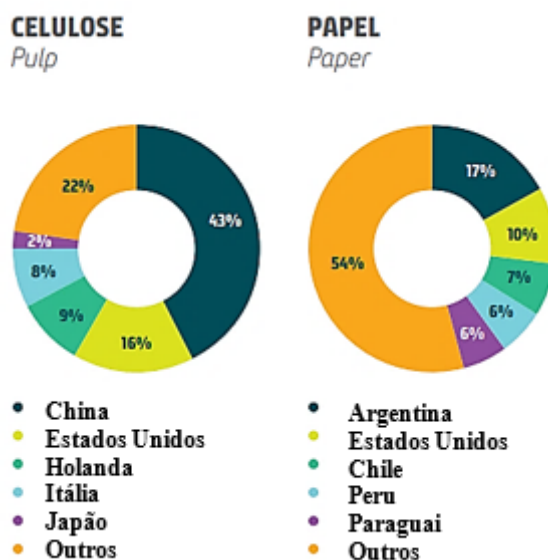
3.1 A indústria de celulose e papel

Responsável por cerca de 128 mil empregos diretos e 640 mil empregos indiretos no país, a indústria de celulose e papel é importante base para a economia brasileira (ABTCP, 2020; JUNIOR; CARVALHO, 2021).

Composta por 220 empresas que atuam em 18 estados e 540 municípios, a indústria de celulose do Brasil é considerada referência mundial. Em 2019, esteve no posto de 2ª maior em produção global, atingindo 19,7 milhões de toneladas fabricadas que contribuíram com 46,5% do produto interno bruto nacional (ABTCP, 2020; IBÁ, 2020).

Este potencial advém da qualidade e origem ambientalmente correta da madeira, proveniente em sua maioria de florestas certificadas, além dos 2,9 milhões de hectares de área florestal preservada (ABTCP, 2020; IBÁ, 2020), que estabeleceram o segmento como o maior exportador mundial; comércio responsável por 75% da destinação do produto fabricado no país, que renderam o total de US\$ 7,5 bilhões em 2019 (IBÁ, 2020). A Figura 1 a seguir, apresenta os principais destinos de exportações de celulose e papel brasileiro.

Figura 1. Percentual dos principais consumidores da celulose e papel exportados do Brasil.



Fonte: Ibá (2020)

3.1.1 Produção de celulose

A primeira etapa da produção de papel é realizada pela conversão da matéria-prima fibrosa a polpa celulósica pelo procedimento mecânico e/ou químico que objetiva a separação

das fibras de celulose da lignina, que corresponde a fração aglutinante das fibras da madeira e que compõem de 15 a 35% do seu peso (BAJPAI, 2010; BERNI; BAJAY; GORLA, 2010; GAUTO; ROSA, 2013; MACHADO, 2017).

O processo produtivo é iniciado pelo processamento da madeira descascada para a forma de cavacos, os quais são cozidos em uma solução aquosa a temperatura e pressão elevadas, que objetiva dissolver a lignina enquanto preserva a resistência da fibra (POKHREL; VIRARAGHAVAN, 2004; GAUTO; ROSA, 2013; MARTINS, 2020).

O termo kraft, deriva do alemão e significa força e resistência (GAUTO; ROSA, 2013). Responsável por mais de 90% da produção de polpa de celulose em todo o mundo, o processo kraft foi desenvolvido em 1879 pelo químico C. F. Dahl, sendo então atualizado pela substituição do carbonato de sódio ao sulfato de sódio (CAMPOS, FOELKEL; 2016; MACHADO; XAVIER; COUTO, 2018; MARTINS, 2020).

O efluente gerado do processo de polpação é denominado licor negro, devido sua cor marrom escuro advinda da lignina dissolvida e seus produtos de degradação, tais como hemiceluloses, resinas, ácidos e fenóis, este último é considerado como a principal fonte poluidora em todo o processo de fabricação da papel (HOODA; BHARDWAJ; SINGH, 2015; RASTEGARFAR; BEHROOZ; BAHRAMIFAR, 2015; VALDERRAMA; ZEDDA; VELIZAROV, 2021). Após o cozimento, a massa originada passa por peneiramento seguido de lavagem para separar a polpa celulósica (BERNI; BAJAY; GORLA, 2010).

3.1.2. Geração de efluente de celulose

Dentre os principais setores apontados globalmente como preocupantes devido ao potencial poluidor encontra-se a indústria de celulose e papel (BRAMHACHARI; REDDY; KOTRESHA, 2016). De elevado consumo de água em seus processos, a indústria consequentemente origina volumes de águas residuárias que podem chegar a 30-60 m³ por tonelada, carregadas por concentrações de demanda química de oxigênio (DQO) que podem alcançar os níveis de 2367,9 mg.L⁻¹ e demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) que pode ultrapassar 600 mg.L⁻¹ (PALIWAL; UNİYAL; RAI, 2015; MACHADO, 2017; BOGUNIEWICZ-ZABŁOCKA; KŁOSOK-BAZAN, 2020).

Além disto, o efluente pode também apresentar cor, sólidos suspensos e compostos tóxicos como fitoesteróis, lignina, além de compostos fenólicos, os quais lhes conferem potencial poluidor caso não sejam tratados adequadamente (OLIVEIRA et al., 2012; MACHADO, 2017; PEITZ; XAVIER, 2017; RAM et al., 2019). A lignina e seus derivados por exemplo, potencialmente integram até 95% da carga total de poluentes da água residuária

advinda da polpação alcalina de papel e celulose (RAJ et al., 2014; DUAN et al., 2016).

Desta maneira, são necessárias medidas mitigatórias e alternativas de tratamento das águas residuárias da indústria de celulose e papel (HEWITT et al., 2008; IPPC, 2015). Associado a esta demanda e a alta dependência de recursos hídricos, nos últimos anos, o setor papelero tem atuado para assumir uma abordagem responsável e de acordo com rigorosas regulamentações de uso sustentável e conservação da água doce (BERNI; BAJAY; GORLA, 2010; KAMALI; KHODAPARAST, 2015; FIGUEIREDO, 2018).

Atualmente, o processo convencional aplicado para a recuperação das águas nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) da indústria de celulose e papel correspondem principalmente a sistemas de lodos ativados e lagoas aeradas. Estas últimas apresentam vantagens como fácil operação, bom rendimento, ecologicamente corretas e econômicas (RAJ et al., 2014; ASHRAFI; YERUSHALMI; HAGHIGHAT, 2015). As lagoas aeradas são comumente empregadas no tratamento de efluente kraft devido seu potencial de redução de DQO e DBO (BERNI; BAJAY; GORLA, 2010; KAMALI; KHODAPARAST, 2015; MACHADO; XAVIER; COUTO, 2018).

No entanto, o sistema de tratamento com Lagoas Aeradas tem sido observado como pouco efetivo para a remoção de toxicidade, cor e compostos recalcitrantes como os compostos lignínicos e seus derivados (KAMALI; KHODAPARAST, 2015; MACHADO; XAVIER; COUTO, 2018).

3. 1.3. Tratamento de efluente de celulose

As lagoas aeradas frequentemente são empregadas para o tratamento biológico de efluentes de celulose e papel devido a facilidade de operação com rendimento que superam os 95% de remoção e chegam a atingir 100% para remoção de toxicidade aguda (CHAMORRO et al., 2009; SUBASHINI, 2015; MACHADO, 2017). Estas lagoas são capazes de armazenar grandes volumes de efluentes com tempo de detenção hidráulica (TRH) de 2 a 10 dias e suportar choques de carga (IPPC, 2015; CHAKRABORTY et al., 2019).

As lagoas aeradas facultativas apresentam dois ambientes, o primeiro um ambiente de aeração onde a matéria orgânica é oxidada pelas bactérias e a segunda uma zona de sedimentação, anóxica, na qual ocorre sedimentação da biomassa e clarificação do efluente tratado (VON SPERLING, 2014; IPPC, 2015; MACHADO, 2017). Na Tabela 1 se resumem os resultados de investigações realizadas em Lagoas Aeradas.

Tabela 1. Eficiências obtidas no tratamento de efluente de celulose e papel em Lagoa Aerada.

Sistema de tratamento	Condições	Efluente	Parâmetro de remoção	Eficiência de remoção (%)	Referência
Lagoa aerada	COV: 0,2 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹ TDH: 2 a 1 dias	Celulose e papel branqueado	DBO ₅ CQO CFT	95% 60% 20%	Chamorro; Xavier; Vidal (2005)
Lagoa aerada	COV: 0,70 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹ TDH: 44,5	<i>Kraft</i> branqueado	DBO ₅ DQO	67% 98%	Belmonte et al. (2006)
Lagoa aerada	COV: 0,81 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹ TDH: 1 d	<i>Kraft</i>	DBO ₅ DQO CFT	95% 65% 48%	Chamorro et al. (2009)
Lagoa aerada	COV: 0,2 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	<i>Kraft</i>	DBO ₅ DQO	99% 60%	Xavier et al. (2011)
Lagoa aerada	COV: NA TDH 5,6 d DQO: 0,45 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	<i>Kraft</i>	DQO	64%	Dykstra; Giles; Banerjeeb; Pavlostathis (2015)
Lagoa aerada (suplementada com enzimas lacase)	COV: 0,2 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	<i>Kraft</i>	DBO ₅ DQO Cor CL	86% 52% 20% 30%	Machado; Xavier; Couto (2018)

Nota: DBO₅ = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO: Demanda Química de Oxigênio, CFT: Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, NA: não apresentado.

Na Tabela 1 se observam remoções de DBO₅ variando de 67 a 99% para efluentes reais tratados em escala plena e de laboratório. Se observa que embora as lagoas aeradas apresentem eficácia de remoção de matéria orgânica, são deficitárias quanto a capacidade de tratamento de compostos recalcitrantes e cor dos efluentes (KAMALI; KHODAPARAST, 2015; MACHADO, 2017).

3.2 Bioaugmentação de bactérias aderidas em meio suporte

A eficiência de remoção de compostos pode ser potencializada pelos sistemas de biofilme, um método de imobilização celular que permite a adesão da cultura bacteriana a um meio suporte que fornece uma grande área de superfície protegida e aperfeiçoa o metabolismo celular das cepas (IPPC, 2015; BRAMHACHARI; REDDY; KOTRESHA, 2016).

A imobilização das bactérias em biofilmes na superfície de suportes possibilita o tratamento dos efluentes por comportar altas concentrações de biomassa, proporcionando a microbiota resistência às variações de pH, temperatura e choque de carga hidráulica e orgânica (OLIVEIRA et al., 2012; AHMADI et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2019).

O sistema Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) em português denominado como Reator Biológico com Leito Móvel (OLIVEIRA et al., 2012), por exemplo, corresponde ao

processo empregado na última década para tratar águas residuais. O sistema consiste em um reator repleto de meio suporte que fornecem uma grande área de superfície protegida para a adesão e crescimento de microrganismos decompositores, formando assim o biofilme (VILLAMAR et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; IPPC, 2015; SUBASHINI, 2015). Os meios de suporte se distribuem em um leito móvel MBBR em decorrência do sistema de aeração de bolhas que fornece oxigênio e ao mesmo tempo favorece a mobilidade dos suportes e eficiente contato com a massa líquida em suspensão (OLIVEIRA et al., 2012; SUBASHINI, 2015).

Definidos como agregados de microrganismos frequentemente incorporados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), os biofilmes se configuram como um dos modos de vida mais bem-sucedidos na Terra (FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING, et al. 2016).

Composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e lipídios, a matriz EPS imobiliza as células do biofilme proporcionando um interespaço para microconsórcios sinérgicos, ou seja, os microrganismos pela estreita associação entre si quando retidos no biofilme, trocam nutrientes e realizam permuta genética o que possibilita maiores tolerâncias a antibióticos, moléculas tóxicas e resistência à fagocitose pelos protozoários (FLEMMING, et al. 2016; MADIGAN et al., 2016).

Uma vez que os meio suportes oportunizam um maior tempo de retenção de células viáveis (OLIVEIRA et al., 2012; RAM et al., 2019), a biomassa aderida potencialmente é mais eficiente para a biodegradação de uma variedade de produtos químicos dos efluentes do que as células livremente suspensas (RAM et al., 2019).

Por esta razão, tecnologias de imobilização tem recebido atenção considerável e diferentes tipos de materiais têm sido amplamente estudados para imobilização celular (PALIWAL; UNİYAL; RAI, 2015). Alguns pesquisadores empregaram zeólitas, carragenanas, gel de poliacrilamida entre outros materiais para imobilização, entretanto estes se apresentaram ineficazes devido a difusão restrita ou baixa resistência mecânica (WANG; WU; ZHANG, 2017).

Pesquisas alternativas buscaram investigar o potencial de algumas fontes materiais como meios de suporte, como apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Eficiências de tratamentos de efluentes com aplicação de meios de suporte

Sistema de tratamento	Efluente	Meio Suporte	Microrganismo	Parâmetro de remoção	Eficiência de remoção (%)	Referência
Biorreator aeróbio de bancada	Celulose e papel	Malha de náilon	<i>Merulius aureus</i> ; <i>Phlebia</i> ; gênero não identificado e <i>Fusarium sambucinum</i>	DQO CL Cor	89% 79% 79%	Malaviya; Rathore (2007)
Reator MBBR	Kraft	Natrix C2	Biomassa de reator	DBO ₅ DQO Cor CFT	98% 65% 50% 55%	Villamar et al. (2009)
Reator de coluna	Celulose e papel	Espuma poliuretano (PUF)	<i>Bacillus subtilis</i>	DBO ₅ DQO Lignina CFT	81% 76% 65% 61%	Gandhi; Udayasoorian; Meda (2010)
Reator MBBR	Celulose e papel	Biofilm ChipTM-P	Biomassa de reator	DBO ₅ DQO	35% 56%	Oliveira et al. (2012)
Reator em batelada	Licor negro	Cubos de sabugo de milho	<i>Bacillus megaterium</i> ; <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (autóctones)	DQO CL Cor	79% 82% 89%	Paliwal; Uniyal; Rai (2015)
Reator MBBR	Celulose kraft	Kaldnes K3	-	DBO ₅ DQO	94% 48%	Vanzetto et al. (2014)
Reator de lote de sequenciamento (SBR)	Celulose e papel	Hexafiltro 3D	Biomassa de reator	DQO	68%	Hasan et al. (2016)
Reator MBBR	Celulose kraft	AMB	-	DBO ₅ DQO Cor	92% 40% 10%	Peitz; Xavier (2017)
Reator em batelada e Reator de leito fluidizado (FBR)	Celulose e papel	PMS	<i>Planococcus</i> sp.	DQO CL Cor	85% 74% 81%	Majumdar et al. (2019)
Lagoa aerada com suporte esponjoso	Celulose kraft	APG Aquaporo usgel	Biomassa de reator (autóctone)	DBO ₅ DQO CL Cor CFT	75% 50% 10% 20% 18%	Peitz; Xavier, (2019)

Nota: DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO: Demanda Química de Oxigênio, CL: compostos lignínicos, CFT: Compostos Fenólicos Totais, AMB = Mídia de base mineral - alginato de sódio; PMS = Lodo seco de fábrica de papel.

Na Tabela 2 se observa a variedade de meios suportes, microcosmos e sistemas em batelada e um exemplo de pesquisa utilizando Lagoa Aerada para o desempenho na remoção de matéria orgânica global, estes apresentaram eficiência de 98% em média na remoção de DBO₅, alcançando para compostos específicos de efluentes de celulose níveis de 10% a cerca de 80% de tratamento em reatores em batelada. Entretanto, a maioria das indústrias de celulose

e papel utilizam lagoas aeradas como principal sistema de tratamento de efluentes, portanto, a aplicação de meios de suporte nestes sistemas, corresponde a uma alternativa para propiciar o crescimento de biomassa aderida e estável para o tratamento de efluentes.

Desta maneira, o emprego de bactérias aderidas a meio suporte configuram a uma promissora alternativa para atualização das estratégias de tratamento de efluentes da indústria kraft.

3.2.1. *Advenella kashmirensis*

Isolada pela primeira vez em 2005 em solo temperado da região de Kashmir, Índia, esta espécie bacteriana foi inicialmente denominada como *Tetrathiobacter kashmirensis* (GHOSH et al., 2005) e reclassificada para o gênero *Advenella* como proposto inicialmente por Coenye et al. (2005) e relatado por Gibello et al., (2009).

Da classe Betaproteobacteria, e família Alcaligenaceae, o gênero *Advenella* possui poucas espécies descritas, entretanto, são difundidas em ecossistemas naturais, sendo encontradas em amostras de solo, lodo ativado e rizosfera de plantas (KUZMINA et al., 2022).

A descrição da espécie a caracteriza como gram-negativas, não flageladas, com tamanho celular de 1,0 a 1,8 μm , de morfologia oval a cocoides que ocorrem isoladamente ou como cadeias ramificadas/aglomerados em colônias opacas e brancas cremosas (GHOSH et al., 2005; SHMAREVA et al., 2016).

Sobrevivem a faixas de temperatura de 10 a 42 °C, sendo a temperatura ótima 26°C e entre pHs de 4,5 e 8,5. São facultativamente quimiolitotróficas podendo utilizar o tiosulfato ou tetracionato como fonte de elétrons e energia. Podem também reduzir nitrato a nitrito (GHOSH et al., 2005; BACDIVE, 2022).

O sequenciamento da cepa W13003 de *Advenella kashmirensis* por Wang et al. (2014), apontou que a espécie é não patogênica, não apresentando genes associados a virulência ou doença, invasão celular ou resistência intracelular.

Dentre os estudos relacionados a espécie, cita-se a pesquisa de Kuzmina e colaboradores (2022), que investigaram o potencial de *A. kashmirensis* isoladas do solo de caverna em Kinderlinskaya, Rússia, em solubilizar compostos orgânicos e minerais de fósforo em experimentos de estresse salino com plântulas de trigo. Os pesquisadores verificaram efeito promotor de crescimento vegetal causado pela cepa bacteriana devido a mobilização de fosfato e produção de ácido indolacético (IAA), resultando em aumento da produtividade das plantas.

Frente a biorremediação, encontra-se o estudo de Hao; Mu; Li (2013), que investigaram o potencial de remoção de petróleo bruto por *A. kashmirensis* isolada da água do mar e cascalhos

contaminados da Baía de Dalian, China. Onde após sete dias de experimento, a espécie foi capaz de remover 46% do composto.

Desta maneira, o uso da espécie *Advenella kashmirensis* em processos de tratamento de efluentes é recente, sendo a pesquisa de Silva; Couto; Xavier (2021), uma das literaturas recentes que cita sua utilização para bioaugmentação e tratamento de águas residuárias; frente aos resultados positivos de tratabilidade encontrados pelos autores, a presente pesquisa objetiva investigar o desempenho desta bactéria imobilizada em biofilme em suporte esponjoso no tratamento de efluente de celulose por bioaugmentação.

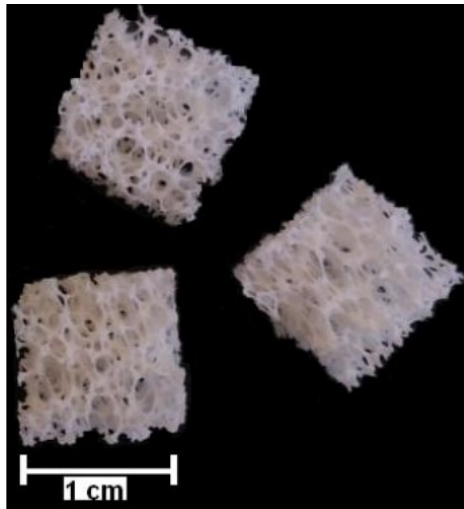
3.2.2 Uso e características dos meio suportes

Os meios de suporte geralmente são fabricados em polietileno ou polipropileno, são inertes e possuem elevada área superficial (OLIVEIRA et al., 2012; PEITZ, 2018), com dimensões de 350 a 1000 m²/m³ que conferem grande área de adesão de microrganismos e um maior tempo de retenção que também dependem do desenho geométrico do portador (OLIVEIRA et al, 2012).

Dentre os meios de suporte disponíveis, o AQUAPOROUSGEL® (APG) da Nisshinbo Chemical Inc., apresenta natureza hidrofílica e estabilidade que os conferem potencial para colonização de bactérias (PEITZ, 2018; SUBSANGUAN, 2020). Esta esponja comercial fabricada pela Nisshinbo Chemical Inc. Tóquio, Japão, apresenta dimensão média de 0,7 × 0,7 cm com arestas de 10 mm (Figura 2) (PEITZ; XAVIER, 2019; SUBSANGUAN, 2020).

De formato cúbico e constituído em resina de poliuretano (80%), sulfato de bário (<10%) e polietileno polipropilenoglicol (<3%) que lhe conferem estabilidade, resistência à abrasão e alta porosidade (SUBSANGUAN, 2020), o APG pode alcançar uma área superficial específica superior a 3000 m².m⁻³ e devido a estas qualidades foi aplicado em alguns estudos para imobilização de células bacterianas (PEITZ, 2018; PEITZ; XAVIER, 2019; SUBSANGUAN, 2020).

Figura 2. Meio suporte APG



Fonte: Peitz (2018)

Além disto o APG foi projetado como suporte hidrofílico que absorve a água e facilita a fixação e colonização de bactérias (PEITZ, 2018). Sendo capaz de migrar em fluxo aleatório para o centro da massa líquida do reator devido a aeração (PEITZ, 2018), segundo o fabricante em sistemas de tratamento, o volume do reator deve ser preenchido em 10% pelo APG (PEITZ; XAVIER, 2019).

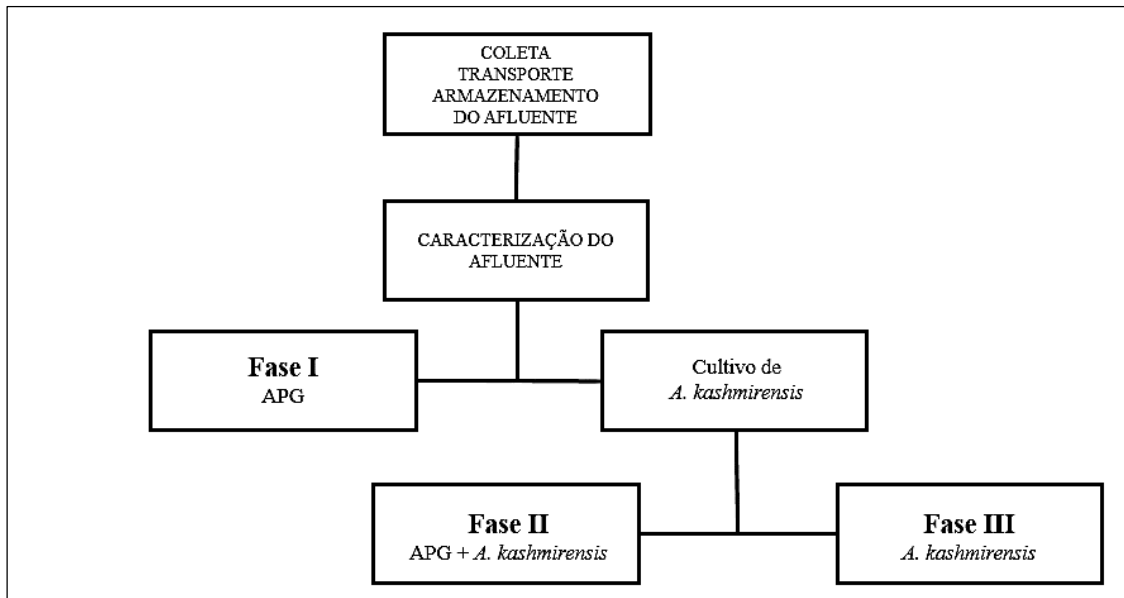
O meio suporte aquaporousgel tem ampla gama de aplicações, sua introdução em sistemas de lagoa aerada tratando efluente de celulose kraft foi realizado por Peitz e Xavier (2019), onde se observou performance aceitável para remoção de matéria orgânica (DQO: 50% e DBO₅: 75%) e compostos recalcitrantes (Cor: 20%, Compostos Fenólicos Totais: 18% e Compostos de lignina: 10%) (PEITZ; XAVIER, 2019).

4. METODOLOGIA

4.1 Sequência experimental

As etapas principais para o desenvolvimento da pesquisa são apresentadas na Figura 3.

Figura 3. Fluxograma das etapas da pesquisa



Fonte: Autoria própria (2023)

A fase I ocorreu entre os meses de novembro a dezembro de 2021, sendo estabelecida pela aplicação do meio suporte APG, cedidos pela Nisshinbo Chemical Inc, na razão de 10% do volume do reator seguindo recomendações do fabricante (NISSHINBO CHEMICAL INC., 2019). A lagoa aerada foi operada por 46 d, para se chegar ao estado estacionário do sistema de tratamento.

Durante os meses de janeiro a maio de 2022, foram realizados os ensaios de cultivo, crescimento e avaliação da viabilidade celular do biofilme de *A. kashmirensis* no APG. Esta etapa correspondeu a preparação do inóculo da bactéria autóctone utilizada nos experimentos que ocorreram em simultâneo durante 63 d, nos meses de junho a setembro de 2022.

Na fase II a bactéria foi adicionada a lagoa aerada sobre a forma de biofilme aderido ao meio suporte APG. Na fase III a bactéria foi adicionada ao sistema na forma livre/planctônica. Foi realizada a adição de 10 ml de meio de cultura com *Advenella kashmirensis* em ambas as lagoas a cada 15 dias, a fim de repor a concentração *A. kashmirensis* nos reatores que poderiam ser carreadas da lagoa ao longo do tempo, devido a adição contínua de volumes de afluentes para o interior da lagoa de tratamento, em ciclos de quatro vezes por dia.

4.2 Etapas experimentais

4.2.1 Metodologias utilizadas

O afluente utilizado para tratamento no sistema de lagoa aerada foi gentilmente cedido por uma indústria de celulose kraft sem branqueamento da região metropolitana de Curitiba, com acordo de cooperação técnica (ACT nº 02/2021) com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

O afluente foi coletado na calha Parshall, na entrada do sistema de tratamento da indústria e transportado para o Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias - LATAR da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Na Tabela 3 a seguir, são apresentados os parâmetros analisados e as metodologias utilizadas para monitorar o sistema de tratamento durante as operações das lagoas aeradas desta pesquisa.

Tabela 3. Caracterizações do efluente e da bactéria autóctone

Parâmetros	Metodologia/Equipamentos	Periodicidade
Atividade biológica	Driessche et al. (2014); Labadie et al. (2021)	Antes da operação das LAs
Área espectral	Machado (2017)	2 vezes por semana
Cor (440nm)	Chamorro et al. (2009)	2 vezes por semana
COT (mg L ⁻¹)	5310 B – APHA (2017)	1 vez por COV
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	5210 B – APHA (2017)	2 vezes por semana
DQO (mg L ⁻¹)	5220 D – APHA (2017)	2 vezes por semana
CFT (mg L ⁻¹)	Chamorro et al. (2009)	2 vezes por semana
Imobilização bacteriana	Scherer et al. (2022)	Antes da operação das LAs
CL (UV280nm)	Çeçen (2003)	2 vezes por semana
OD (mg L ⁻¹)	Oxímetro Lutron DO5519	Quinzenalmente
ORP	Heroso (2016); USGS (2005)	Quinzenalmente
pH	pHmetro CienlaB mPA210	2 vezes por semana
Temperatura ambiente	NBR 9898 – ABNT (1987)	2 vezes por semana
Turbidez	Turbidímetro Policontrol AP2000	2 vezes por semana
SST e SSV (mg L ⁻¹)	2540 D, E, F – APHA (2017)	1 vez por COV
SAT e SAT (mg L ⁻¹)	2540 D, E, F – APHA (2017); Melchioris (2019)	1 vez por COV

Nota: CFT: Compostos Fenólicos Totais; CL: compostos lignínicos; COT: Carbono Orgânico Total; COV: carga orgânica volumétrica; DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO: Demanda Química de Oxigênio; OD: oxigênio dissolvido; ORP: Potencial de Oxirredução; SST: Sólidos Suspensos Totais; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis; SAT: Sólidos Aderidos Totais; SAV – Sólidos Aderidos Voláteis.

Para as caracterizações, as amostras foram previamente filtradas em membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm, sendo as eficiências de remoção determinadas pela quantificação das concentrações iniciais (do afluente da lagoa) e finais (do efluente tratado na lagoa), dos parâmetros físico-químicos DBO₅, DQO, Compostos Fenólicos Totais, Cor, Compostos Lignínicos, Turbidez e Área Espectral.

A Área Espectral corresponde a um método rápido e confiável para o monitoramento de águas residuais. A varredura realizada em 200 a 800 nm em espectrofotômetro UV-Vis, possibilita a leitura da faixa de absorvância da amostra, que após tratamento biológico tendem

a diminuir, indicando a degradação de compostos do efluente (OGUGBUE, SAWIDIS; 2011; MANJULADEVI; KALAISELVAN; 2020).

O potencial de oxirredução foi medido em medido de ORP (Heroso; 2016), o método possibilita investigar a disponibilidade de elétrons livres e a tendência oxidante ou redutora da água (JAMES, COPELAND; LYTHER, 2004). Sua leitura é quantificada em milivolts - mV, sendo necessário que os resultados de leitura do equipamento, denominado de potencial de junção líquida, sejam transformados em mV pela multiplicação da leitura em 1000 vezes, como sugerido pela USGS (2005).

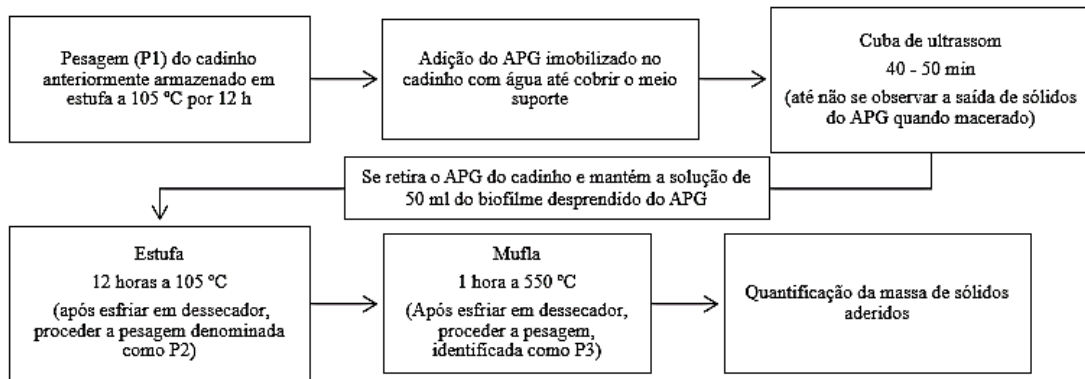
O leitor de ORP realiza a leitura em relação a um eletrodo de referência (VASCONCELLOS, 2015). Para esta pesquisa, o valor de referência para calibração do eletrodo ORP correspondeu a medida de +236 mV, especificada pelo fabricante no manual do equipamento (HEROSO, 2016). Com os valores das leituras das amostras frente aos valores de referência é possível transformar os resultados de leitura do eletrodo ORP, para o valor de potencial redox (Eh), descritos por Jardim (2014), como sendo a soma destes resultados.

Também foi realizada a análise da superfície do meio de suporte e dos biofilmes formados, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Curitiba, sede Centro. Para analisar a adesão de biofilme na superfície do meio suporte esponjoso ao final da operação das lagoas da fase I e II.

Para o MEV as amostras de APG após os dias de operação da lagoa, foram secas em liofilizador e posteriormente metalizadas em ouro no equipamento Quanta Quorum Q150R ES para análise no microscópio eletrônico de varredura, com filamento de tungstênio e câmara para amostras de até 250 mm de diâmetro e massa de 500 g com movimento total do estágio (XYZ e inclinação) ou 2 kg com movimento em XYZ ou 5 kg como movimento apenas em XY.

O crescimento do biofilme também foi analisado pelo parâmetro sólidos aderidos, investigado através do crescimento da biomassa aderida após 46 dias de operação para fase I e 63 dias para fase II, sendo portanto, amostradas no estado estacionário dos sistemas de lagoa aerada, conforme adaptação das metodologias 2540 D, E e F APHA (2017) com alterações propostas por Melchior (2019). Na Figura 4 apresenta-se o fluxograma dessa análise, onde as unidades de suporte esponjoso APG foram adicionadas a béqueres com 50 ml de água deionizada e submetidas a banho de ultrassom por 30 minutos. Após isso os APGs foram removidos dos béqueres e o conteúdo líquido transferido para cadinhos de porcelana, e então analisado conforme a metodologia APHA (2017), onde as amostras foram secas em estufa a 105°C por 12 horas e calcinado a 550°C por 1 hora.

Figura 4. Fluxograma do esquema metodológico da determinação de sólidos aderido



Fonte: Adaptado de Melchiors (2019)

Equações da quantificação da massa de sólidos aderidos (MELCHIORS, 2019):

Sólidos Aderidos Totais – SAT

$$\text{SAT (g)} = (\text{P2} - \text{P1}) \quad (\text{Equação 1})$$

Sólidos Aderidos Voláteis – SAV

$$\text{SAF (g)} = (\text{P3} - \text{P1}) \quad (\text{Equação 2})$$

Sólidos Aderidos Fixos – SAF

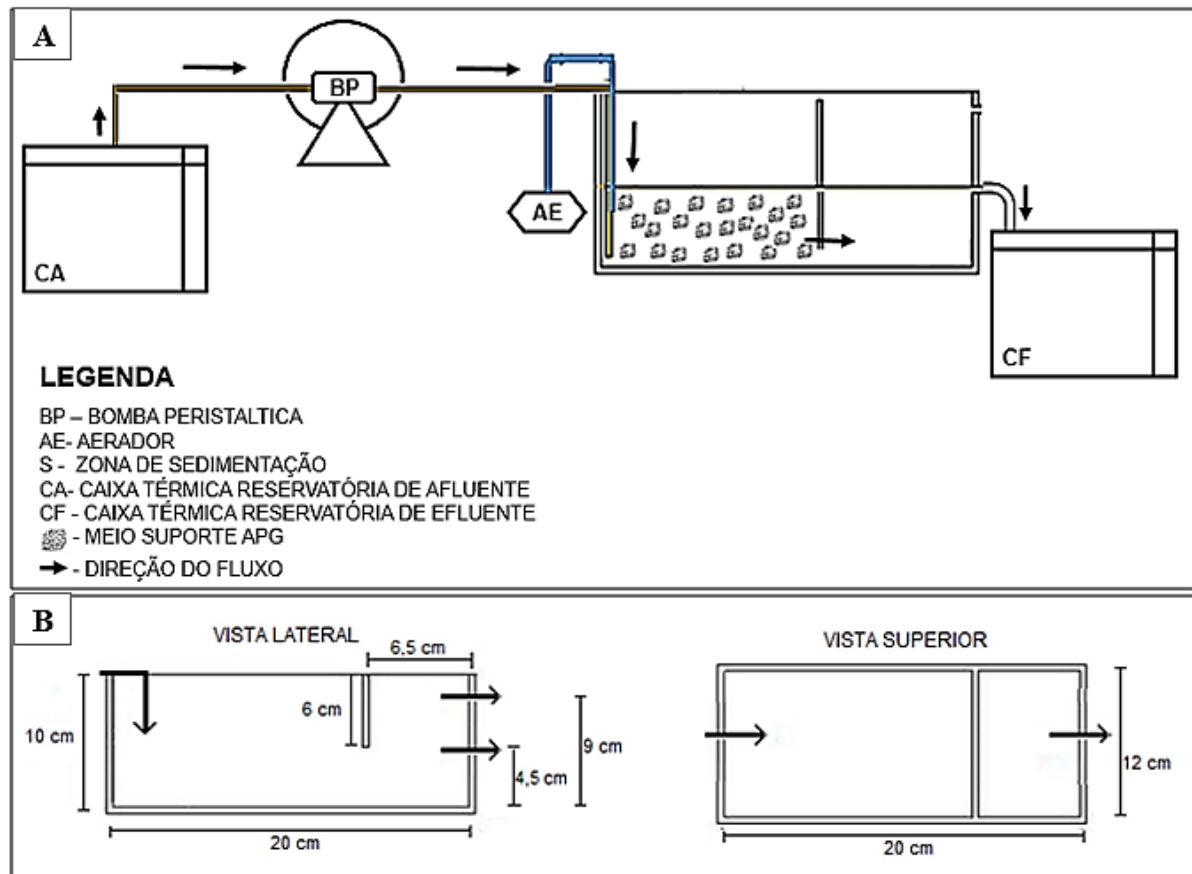
$$\text{SAF (g)} = (\text{SAT} - \text{SAV}) \quad (\text{Equação 3})$$

A quantificação do nível de imobilização (mg.L^{-1}) foi realizada pela multiplicação da massa (mg), pelo número de unidades de APG adicionadas as LAs dividido pelo volume útil (L) do mesmo, conforme proposto por Melchiors (2019).

4.3 Sistema de tratamento LA – APG

O sistema de tratamento biológico contínuo foi operado no Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias (LATAR) da UTFPR – Curitiba, em lagoa aerada de bancada com 1 L de volume útil (Figura 5 a e b) preenchido em 10% por cubos de 1cm^3 de meios de suporte esponjoso APG, conforme a recomendação do fabricante.

Figura 5. Esquema da Lagoa de bancada



Fonte: a) Autoria própria (2023); b) Machado (2017)

A recarga de efluente na LA, foi realizada por bombas peristálticas (modelo Milan - BP 600), sendo mantida a mesma carga orgânica volumétrica (COV) de $0,2 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, que representa a carga média utilizada pela indústria que cedeu o afluente. A manutenção da COV foi realizada pela variação da TDH (d), levando em conta a concentração de matéria orgânica do afluente em termos de DQO ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), de acordo com a Equação 04.

$$COV = \frac{Q \cdot S}{V} \quad (\text{Equação 4})$$

COV = Carga Orgânica Volumétrica preestabelecida ($\text{kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)

Q = Vazão ($\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$)

S = Concentração de substrato no afluente ($\text{kgDQO} \cdot \text{m}^{-3}$)

V = Volume total do reator (m^3)

Para que a LA operasse em condições semelhantes a lagoa em escala real da indústria, foram inoculadas a biomassa proveniente de lodo da indústria de celulose não branqueada no início da operação do reator, para uma concentração de $70 \text{ mgSSV} \cdot \text{L}^{-1}$ no sistema, valor intermediário ao citado por Von Sperling (2014) como recomendável para sistemas de lagoas aeradas tratando água residuária doméstica. Além disto, também foram adicionados

nutrientes ao efluente de entrada para DQO:N:P de proporção de 100:0,5:0,1 (1,9103 g L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl) e 0,5624 g L⁻¹ de fosfato dipotássico (K₂HPO₄). O pH das amostras de entrada de efluente foram corrigidos para 7,00 com soluções de H₂SO₄ (0,01 mol.L⁻¹) e NaOH (0,01 mol.L⁻¹). Enquanto aeração da lagoa foi promovida por bombas de ar (modelo Boyu - U 2800), com vazão de OD de 2L/min.

4.4 Cultivo, formação de biofilme e ensaio de viabilidade de *Advenella kashmirensis*

4.4.1 Cultivo de *A. kashmirensis*

A espécie bacteriana empregue neste estudo foi isolada de um sistema MBBR em escala de bancada modificado com meio suporte esponjoso APG, durante a pesquisa desenvolvida no laboratório de tratamento de águas residuárias (LATAR-UTFPR) pelos autores Silva et al. (2020). Os pesquisadores procederam o isolamento, e posterior identificação da bactéria a partir do sequenciamento com o banco de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI), que apontou a similaridade de 97% da cepa 1B1C001 1 como relacionada a espécie *Advenella kashmirensis*.

Por este motivo para o emprego da espécie neste estudo, inicialmente foi necessário proceder a reativação da bactéria. Para o repique, as colônias isoladas de *A. kashmirensis* em placa de Petri armazenadas sob refrigeração no LATAR, passaram por plaqueamento em meio Nutrient Broth (NB) e incubação em estufa a 28 °C durante 24 horas, como proposto na pesquisa de Sanders (2012).

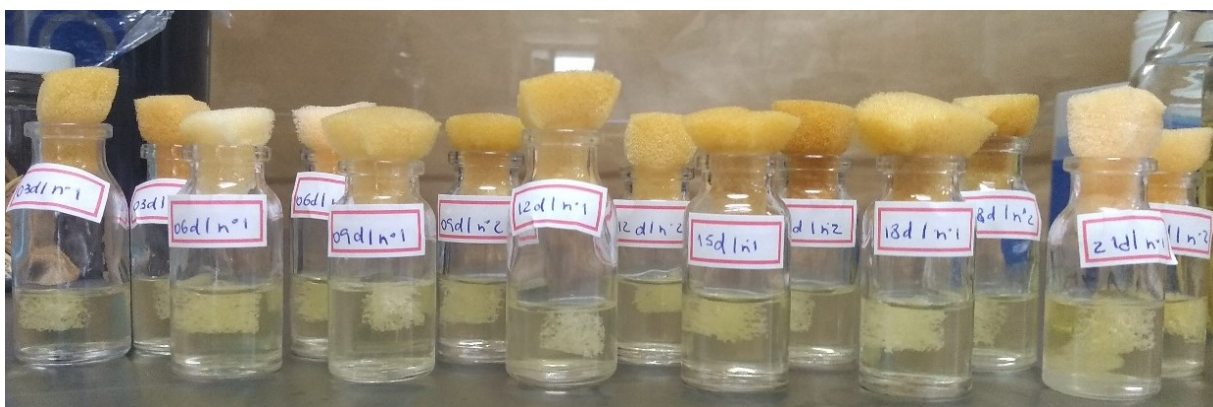
Da placa de *A. kashmirensis* anteriormente citada, se coletou um raspado de colônias isoladas, que foram transferidas para um frasco estéril do tipo penicilina contendo 5 ml de meio líquido Nutrient Broth (NB) seguido de incubação por 24 horas em estufa a 28°C, o frasco foi coberto com um tampo de espuma previamente sanitizado.

Após a incubação do frasco de penicilina em estufa a 28°C por 24 h, foi coletado 5 ml do meio líquido NB agora com cultura bacteriana crescida, o volume foi transferido para um erlenmeyer de 250 ml, composto de 100 ml de meio líquido NB fresco, esta amostra então passou por incubação em agitador Shaker a 26 °C com agitação de 80 rpm, para a investigação da estimativa da concentração de bactérias, onde a cada 1 hora, amostras do meio NB com a cultura bacteriana foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis (600 nm), conforme metodologia descrita por Bombardi (2018) com adaptações. Esta análise busca determinar a concentração de bactérias por ml por densidade óptica, onde valores maiores que 0,60 de absorvância indicam a referência de concentração bacteriana. As análises deste parâmetro nesta pesquisa resultaram em concentração bacteriana de 1×10^8 UFC mL⁻¹.

4.4.2 Ensaio de crescimento de biofilme de *A. kashmirensis*

O ensaio de imobilização foi realizado em 14 frascos de penicilina estéreis (Figura 6), contendo em cada um destes 1 unidade de meio suporte APG (previamente sanitizado com etanol 70% e pesado seco); 5 ml de meio líquido NB estéril e 0,5 ml de meio cultura NB de *A. kashmirensis*. Os frascos foram acompanhados por 21 dias, onde a cada três dias, dois frascos de imobilização eram removidos do experimento, para análise da diferença do peso inicial e final APG conforme a metodologia de Scherer et al. (2022).

Figura 6. Ensaio de imobilização bacteriana



Fonte: Autoria própria (2022)

A análise do peso se procedeu inicialmente pela remoção do APG do frasco de penicilina, e transferência a uma placa de petri que foi levada a estufa microprocessada a 50°C durante 45 minutos com circulação de ar, para secagem do APG. O meio suporte foi manipulado a cada 5 minutos para possibilitar uma secagem total do meio suporte. Após isto, as amostras passaram por resfriamento a temperatura ambiente em dessecador e na sequência foram pesadas em balança analítica.

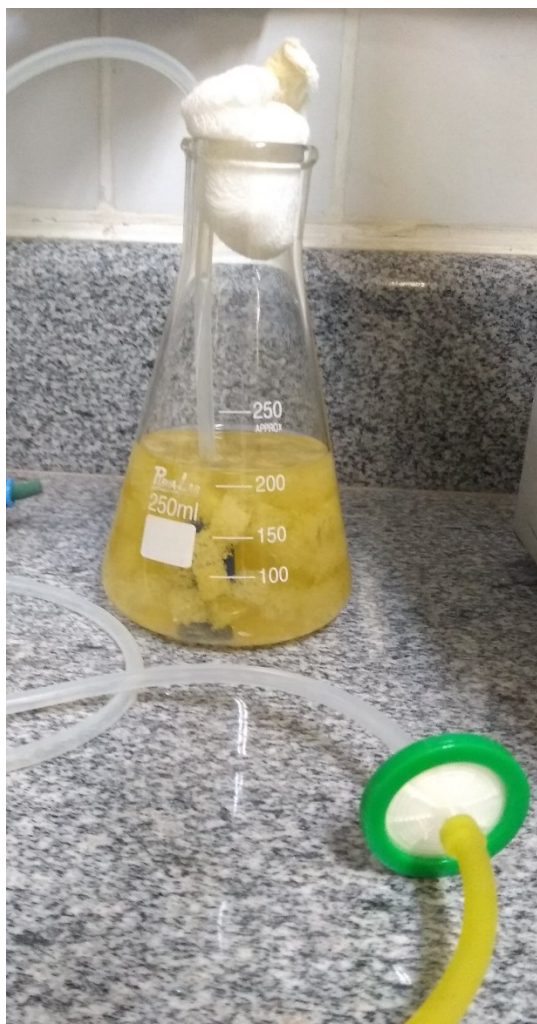
Foi realizado um ensaio de imobilização em paralelo, estruturado para que a bactéria imobilizada nas unidades de APG fossem então inoculadas na lagoa da Fase II deste experimento. O ensaio foi realizado em erlenmeyer de 250 ml, composto de 120 ml de meio estéril NB líquido, 10 ml de meio cultura NB de *A. kashmirensis* e 94 unidades de meio suporte APG (Figura 7), conforme metodologia proposta por Gandhi; Udayasoorian; Meda (2010).

Das 94 unidades de meio APG, noventa unidades foram posteriormente adicionadas a lagoa da Fase II por corresponderem ao total de 10% do volume do reator, dimensão sugerida pelo fabricante. Além disto, 3 unidades foram armazenadas para posterior análise de sólidos aderidos totais, e uma unidade foi reservada para análise MEV.

Os frascos de imobilização receberam aeração por bomba de ar (modelo Boyu - U 2800), e para evitar a contaminação do meio de cultura, o ar que entrava no sistema passava por

membrana filtrante, sendo também utilizada uma pedra de aeração nova e previamente sanitizada com etanol 70%. A unidade experimental (Figura 7) foi mantida sem agitação e sob temperatura ambiente, durante 21 dias.

Figura 7. Meio experimental de imobilização utilizado na fase II do experimento



Fonte: Autoria própria (2022)

4.4.2 Investigação da atividade biológica do biofilme

A medição da viabilidade celular do biofilme aderido de *Advenella kashmirensis* no meio suporte APG imobilizado durante 21 dias, foi investigada conforme metodologia adaptada de Driessche et al (2014) e Dalecki, Crawford; Wolschendorf (2016).

Foram estabelecidas cinco unidades experimentais, que consistiram em frascos de penicilina contendo 1 unidade de APG; 5 ml de meio líquido NB estéril e 500 μ l de meio cultura NB de *A. kashmirensis*.

Após os 21 dias de imobilização as unidades de APG foram transferidas respectivamente para tubos de ensaio estéreis contendo 5 ml de solução tampão PBS (8,2 g de NaCl, 1,05g de

Na_2HPO_4 e 0,355g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ em 100 ml), seguido de mistura completa em Vórtex durante 5 minutos para desprender o biofilme do meio suporte. O APG posteriormente foi removido do tubo de ensaio, segundo metodologia de Mariscal et al (2009) e Dalecki, Crawford; Wolschendorf (2016).

Seguindo metodologia de Dalecki, Crawford; Wolschendorf (2016), se adicionou 16 μl da solução de resazurina 1 $\mu\text{g/ml}$ nos cinco tubo contendo os biofilmes de *A. kashmirensis* desprendidos do APG, como também em dois tubos de controle, um deles consistindo em 5 ml do meio PBS e outro consistindo do meio líquido NB estéril.

O corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3 um 10-óxido) é frequentemente empregado em ensaio de viabilidade celular. Seu mecanismo de ação consiste na transformação da resazurina (azul e não fluorescente) ao corante, produto de reação, resurfina (rosa e fluorescente) pelo metabolismo de células metabolicamente ativas. A produção de resurfina é proporcional a redução da resazurina pelo número de células metabolicamente ativas presentes na amostra (DRIESSCHE et al., 2014; LABADIE et al., 2021). Driessche et al (2014), salienta que os resultados da atividade biológica obtidos pelo método da resazurina convencionalmente apresentam um limite de quantificação de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por biofilme.

A fluorescência corresponde a um processo físico originado quando a molécula fluorescente, denominada de fluoróforo, recebe e absorve uma fonte de energia, esta acaba por elevar seus elétrons até um nível de energia mais alto e instável, denominado estado excitado, que então para retornar ao estado fundamental ou estável, libera a energia acumulada a emitindo sob a forma de luz (LAKOWICZ, 2006; BMG LABTECH, 2022). Esta luz emitida é quantificada como espectro de emissão de fluorescência, e corresponde a intensidade de fluorescência em relação a um comprimento de onda em nanômetros (nm). Sendo que a intensidade de sinal depende da difusão do fluoróforo, por este motivo a emissão quantificada ao longo do tempo pode sofrer flutuações (LAKOWICZ, 2006; BMG LABTECH, 2022).

Uma vez que a conversão da resazurina é dependente do equilíbrio de oxidação redução intracelular, a investigação dos teores de resurfina fornece uma estimativa confiável e simples da vitalidade das células em uma determinada amostra (MEHRING et al., 2021).

Os teores de fluorescência foram avaliados pela aplicação de 50 μl de solução de resazurina em frasco de penicilina com meio NB estéril e em frasco com meio NB com cultura de *A. kashmirensis*, conforme metodologia de proposta por Labadie et al. (2021) com alterações de Driessche et al. (2014). Os frascos foram analisados de hora em hora em espectrofotômetro de fluorescência (modelo Eclipse, marca Varian) do laboratório Multiusuário de análises

Químicas LAMAQ, da UTFPR Curitiba. As amostras foram lidas em comprimento de excitação (λ_{ex}) 535 nm e comprimento de emissão de (λ_{em}) 590nm.

As amostras também foram investigadas em leitora de microplacas (Modelo FluoStarOmega, marca BMG Labtech) do laboratório multiusuário equipamentos e análises ambientais LAMEAA da UTFPR campus Curitiba), conforme procedimento de Dalecki, Crawford; Wolschendorf (2016). Para esta metodologia os comprimentos de onda utilizados foram de $\lambda_{ex}545/\lambda_{em}590$ devido a especificação do aparelho do LAMEAA para a detecção dos teores de resurfina. Para esta análise, durante o intervalo das leituras as amostras foram mantidas em estufa para incubação a 37 °C, sendo analisadas cinco unidades experimentais idênticas, estas haviam passado por 21 dias de imobilização para crescimento do biofilme de *A. kashmirensis* e após este período o biofilme foi removido do APG após agitação em vórtex, e quantificado com a adição de resazurina aos frascos.

4.5 Análises Estatísticas

Os resultados de eficiência de remoção obtidos durante as etapas do tratamento através do sistema LA foram avaliados a partir de análises de variância ANOVA e teste de Tukey no software Statistica 14.0.0.15, para verificar a normalidade dos mesmos e diferença com nível de significância $p < 0,05$ entres os resultados de tratamento do efluente da indústria.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Afluente bruto de celulose Kraft

A caracterização das amostras da indústria, as quais foram utilizadas como afluente do sistema de tratamento nesse trabalho é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Características físico-químicas das amostras de afluente

Parâmetro	Afluente da fase I	Afluente da fase II e III
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	125,28 ±21,09	148,27 ±18,08
DQO (mg L ⁻¹)	515,68 ±18,20	952,11 ±10,14
DBO ₅ /DQO	0,24	0,16
CFT (UV 215nm mg L ⁻¹)	144,34 ±3,88	306,56 ±9,38
Cor (UV440 nm)	0,92 ±0,95	0,68 ±0,03
CL (UV 280 nm)	3,33 ±0,33	7,14 ±0,02
Turbidez	103,50 ±14,01	160,89 ±4,54
Ph	9,88 ±0,12	8,50 ±0,33

Nota: DQO – Demanda Química de Oxigênio. DBO₅ – Demanda Bioquímica de Oxigênio. CFT – Compostos Fenólicos Totais, CL - Compostos Lignínicos, COT – Carbono Orgânico Total. Os valores de desvio padrão representam três amostras industriais, cada uma destas analisadas em triplicata (n=3).

Observa-se que para o afluente usado durante a fase I do estudo, a relação DBO₅/DQO obtida correspondeu a 0,24. Para o afluente de entrada utilizado na fase II e III, a relação DBO₅/DQO quantificada foi de 0,16. Frente aos resultados obtidos e de acordo com Jordão e Pessoa (2016) que citam a boa biodegradabilidade de valores acima de 0,30, o efluente utilizado neste estudo é considerado recalcitrante.

Nunes (2021) em estudo empregando lagoa aerada com COV de 0,2 kgDQO.m⁻³d⁻¹, tratando efluente kraft de mesma origem da amostra deste estudo, com relação DBO₅/DQO de 0,28, encontrou eficiências de remoção de 94% de DBO₅, 51% de DQO, 49% de COT. Por outro lado, parâmetros considerados recalcitrantes foram pouco removidos, sendo observado a remoção de 13% de compostos lignínicos e acréscimo do parâmetro CFT.

No estudo de Villamar (2009), utilizando sistema MBBR com efluente de razão DBO₅/DQO de 0,23, faixa considerada pela literatura também abaixo do recomendado para tratamentos biológicos, alcançou remoções de 98% de DBO₅ e 52% de DQO.

5.2 Formação de biofilme e ensaio de viabilidade de *Advenella kashmirensis*

5.2.1 Investigação do biofilme de *Advenella kashmirensis*

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de alteração de peso dos meio suporte APG empregados no ensaio de imobilização de *A. kashmirensis* em frascos de penicilina, que foram analisados a cada três dias.

Tabela 5. Perfis de Imobilização de *A. kashmirensis* em APG

Amostra	Imobilização (dias)	Peso inicial - Pi (mg)	Peso Final – Pf (mg)	Pf – Pi (mg)	Média (mg)	Desvio Padrão
03 d / nº 1	3	27	31	4		
03 d / nº 2	3	31	36	5	4,5	0,0008
06 d / nº 1	6	34	39	5		
06 d / nº 2	6	28	33	5	5	0,0003
09 d / nº 1	9	27	32	5		
09 d / nº 2	9	35	40	5	5	0,0001
12 d / nº 1	12	30	35	5		
12 d / nº 2	12	32	38	6	5,5	0,0012
15 d / nº 1	15	32	54	22		
15 d / nº 2	15	31	46	15	18,5	0,0049
18 d / nº 1	18	35	41	6		
18 d / nº 2	18	33	37	4	5	0,0006
21 d / nº 1	21	35	45	10		
21 d / nº 2	21	29	36	7	8,5	0,0017

Se observa que a diferença de peso seco do APG sem imobilização e peso após a imobilização de *A. kashmirensis*, durante os dias 03 ao dia 12, permaneceram próximos a 5 mg.

Os frascos nomeados como dia 15, 18 e 21, receberam volumes de meio NB fresco no 12º dia do experimento devido o consumo e evaporação do meio nutriente nos frascos de penicilina. Possivelmente esta adição do caldo nutriente foi responsável pelo crescimento observado na pesagem do dia 15, em que a média final dos pesos se elevou para 18,5 mg.

Pode ter ocorrido um desprendimento do biofilme para manutenção de células ativas em áreas de interface com o oxigênio dissolvido no meio. Isto pode explicar o motivo da diminuição de peso observada na amostra do dia 18, em que se retornou a média de 5 mg.

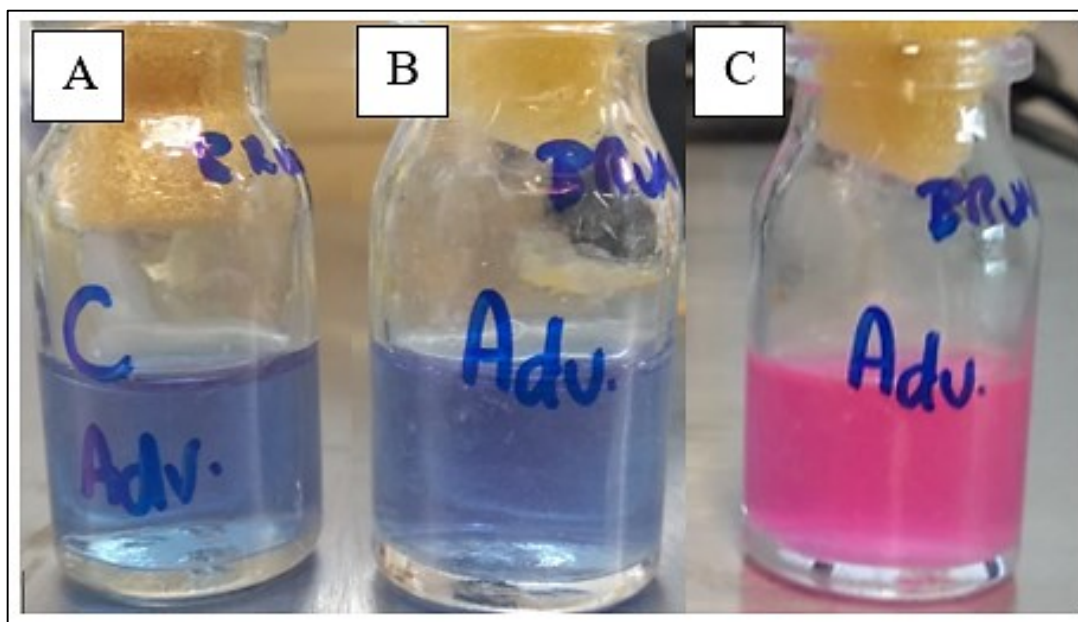
Para as amostras do dia 21, foi verificado um crescimento de 8,5 mg no peso final do APG imobilizado com a bactéria autóctone, se estima que o meio fresco possibilitou uma renovação do biofilme com células de *A. kashmirensis* ativas, desta maneira este dia foi considerado o ideal para a investigação de imobilização e inóculo na lagoa da fase II.

5.2.2 Investigação da viabilidade biológica de *Advenella kashmirensis*

Para descrever a atividade fisiológica das células vivas dentro da população foi investigada a viabilidade celular pela contagem de células ativas e interação do destas com o corante fluorescente resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3 um 10-óxido).

A Figura 8, apresenta imagens do ensaio prévio, realizado para confirmar a aplicabilidade da metodologia para inferir a viabilidade celular de *A. kashmirensis*. Sendo registrado o frasco de penicilina com resazurina e cultura celular bacteriana durante a montagem do experimento (Figura 8a e 8b) e 24 horas após a montagem e incubação das amostras em estufa a 28 °C (Figura b).

Figura 8. Ensaio de viabilidade celular de *A. kashmirensis*



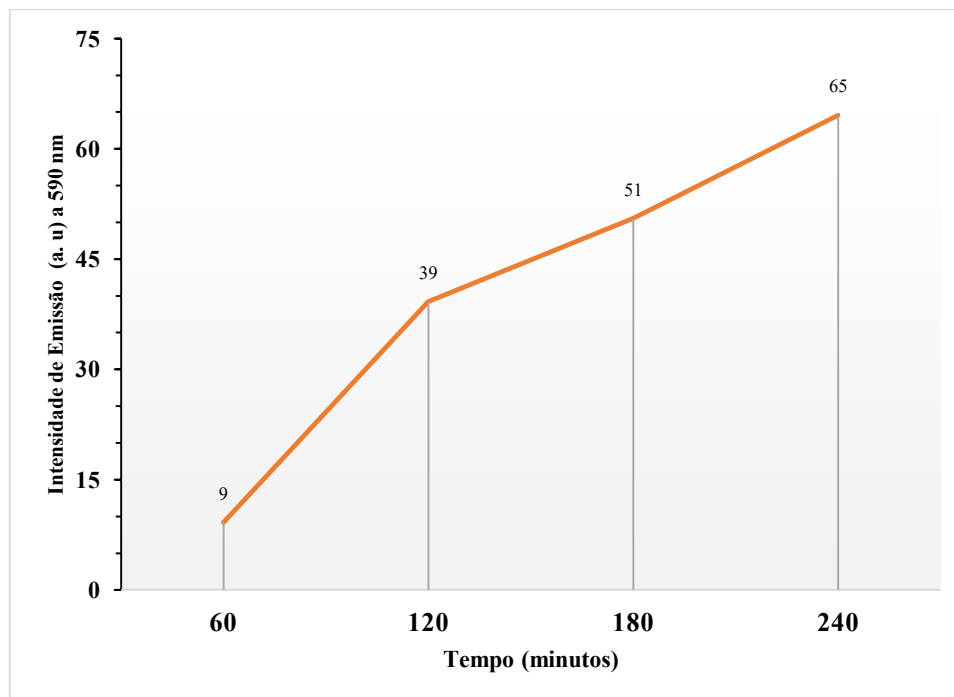
(a) Frasco controle: sem inoculação de *A. kashmirensis* (b) Frasco *A. kashmirensis* inoculada recém adicionado resazurina (c) Frasco *A. kashmirensis* inoculada após 24 horas e incubação em estufa a 28 °C. Fonte: autoria própria (2022).

Como se observa na Figura 8, a bactéria foi capaz de metabolizar a resazurina, corante azul não fluorescente a resurfina, corante rosa fluorescente. Com esta comprovação prévia foi então realizada a investigação da viabilidade celular do biofilme de *A. kashmirensis* após 21 dias de imobilização pela intensidade de emissão de fluorescência das amostras.

Dados na literatura indicam que a resazurina possui faixa de excitação de 540-580 nm e de detecção em 590 nm. Sendo geralmente estimada pela correlação entre uma curva de concentrações de suspensão bacterianas previamente quantificadas em que posteriormente se insere determinado volume do corante, que é metabolizado e detectado por aparelho detector de fluorescência ao longo do tempo, produzindo desta maneira uma cinética de reação de primeira ordem (DRIESSCHE et al., 2014; DALECKI, CRAWFORD; WOLSCHEHENDORF, 2016; DONEUX et al., 2016; MEHRING et al., 2021).

Tendo em vista as dificuldades em produzir uma curva de suspensão bacteriana precisa, devido ao volume total do biofilme, onde se estima que 90% do peso consiste na matriz EPS e 10% de massa de células de microrganismos (FLEMMING; WINGENDER, 2010) se optou investigar a atividade das células ativas de *A. kashmirensis* pela quantificação dos teores de resurfina detectados na faixa de 590 nm. Sendo os resultados do ensaio da viabilidade do biofilme por análise em espectrofotômetro de fluorescência apresentados na Figura 9.

Figura 9. Atividade do biofilme de *A. kashmirensis* em função da emissão resurfina detectado em espectrometria de fluorescência.



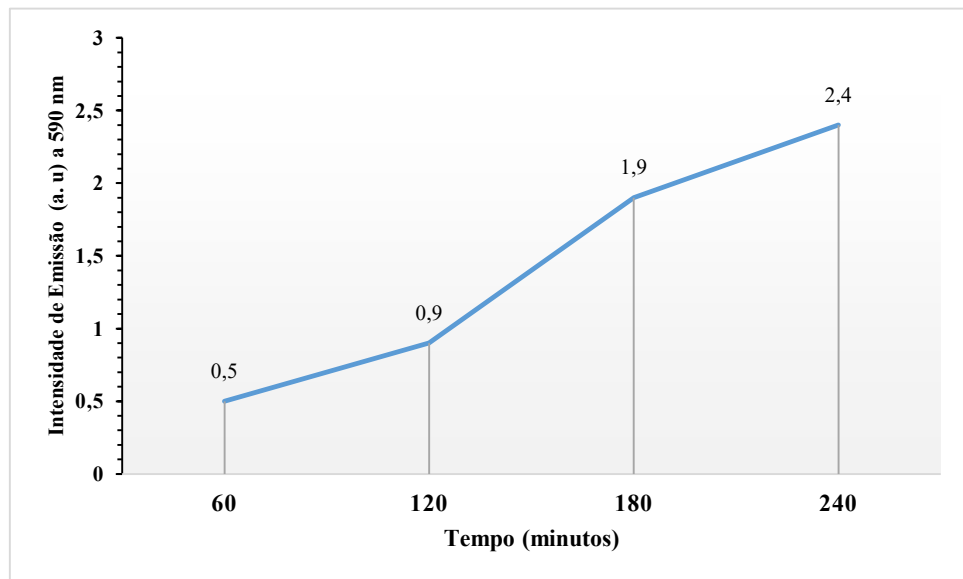
Frente aos resultados se constata a detecção da resurfina pelo equipamento nos intervalos de leitura de 60, 120, 180 e 240 minutos. Se verifica que as amostras tenderam a emitir maiores valores de emissão de fluorescência a longo do tempo, ou seja, as células de *A. kashmirensis* metabolicamente ativas ao longo do tempo transformaram o corante resazurina ao seu composto fluorescente resurfina. Desta maneira se constata que na amostra existe concentração de células bacterianas vivas e metabolicamente ativas, após 21 dias de operação do experimento de imobilização.

Conforme citado por Lakowicz (2006), a intensidade de sinal de emissão de fluorescência detectados em uma amostra depende da difusão do fluoróforo na amostra. Por esta razão, também foi investigada a intensidade de emissão de fluorescência da resazurina por células ativas do biofilme de *A. kashmirensis* em leitor de microplacas.

Para esta investigação a placa com as respectivas amostras foi incubada a 37 °C durante os intervalos das análises. Tanto para estar de acordo com o que é convencionalmente empregado na literatura como também para induzir pela elevação da temperatura o aumento das reações químicas e enzimáticas do metabolismo bacteriano, como expresso por Madigan e colaboradores (2016).

Desta maneira a Figura 10 apresenta os resultados obtidos pela emissão de fluorescência de *A. kashmirensis* em ensaio em leitora de microplacas.

Figura 10. Determinação do biofilme ativo de *A. kashmirensis* em função da emissão resurfina detectado em leitora de microplacas



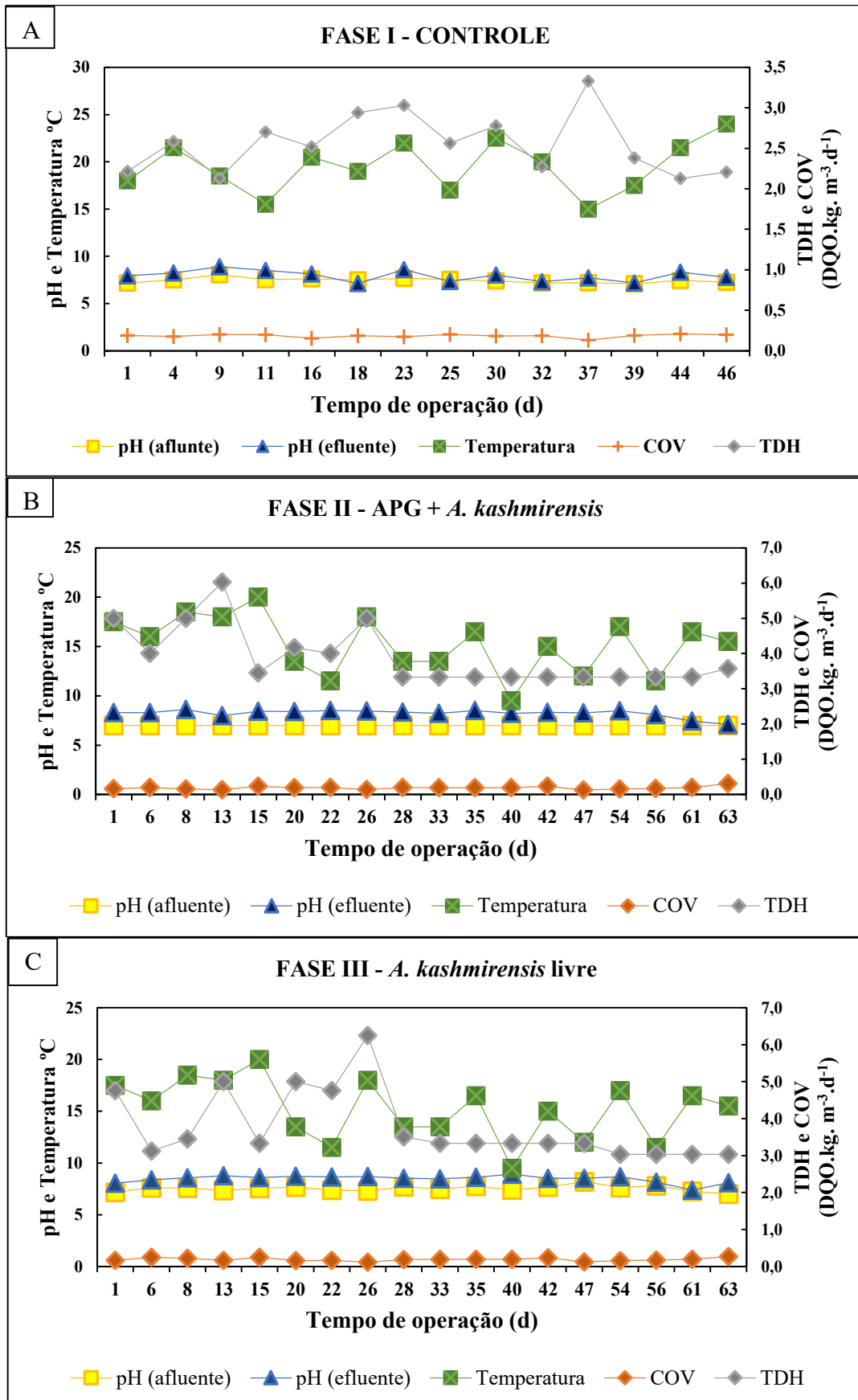
A partir dos resultados apresentados, se constatou que o biofilme de *A. kashmirensis* são constituídos por células ativas, visto que a resazurina foi metabolizada em resurfina e detectada pela leitora de microplacas.

Travnickova e colaboradores (2019), investigaram a presença de células ativas de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* aderidas em membranas filtrantes denominadas como controle e antimicrobianas, incubadas em solução de resazurina por 4 h a 37 °C. A partir da análise da emissão de fluorescência lida a cada 30 minutos em 12 horas, os pesquisadores observaram que a transformação da resazurina por células viáveis decaiu significativamente nas membranas do tipo antimicrobianas do que em relação ao de controle, atestando a portanto, a viabilidade de utilização da emissão de fluorescência como metodologia para comprovação de células viáveis na amostra e também o potencial antisséptico das membranas antimicrobianas, no estudo.

5.3 Parâmetros de operação das LAs

Na Figura 11 (a), (b) e (c) a seguir são apresentados os parâmetros de controle COV, TDH, pH e temperatura durante as fases de operação das lagoas aerada.

Figura 11. Parâmetros de controle de tratamento



A COV média aplicada nos experimentos correspondeu a $0,2 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, valor de acordo com a realidade da indústria, resultando em TDH média para a fase I de 2,56 d, e de 3,90 d e 3,78 d para a fase II e III respectivamente.

O pH de entrada foi ajustado para 7,00, e durante a operação tendeu a elevações, apresentando uma média de 7,94 para a fase I; 8,23 para a fase II e 8,46 para a fase III. Similar ao observado por Pazda (2022) que tratando efluente kraft em LAF obteve um pH do efluente médio de $8,1 \pm 0,43$.

Para Sperling (2014), o aumento de pH observado em sistemas de lagoas é obtido devido a formação de carbonato em zonas anaeróbias. Associado a isto, Flemming e colaboradores (2016), apontam que a matriz de substâncias poliméricas extracelulares EPS dos biofilmes além de função estrutural, proporciona retenção de substâncias. As camadas do biofilme podem estabelecer gradientes funcionais, que são originadas quando a população do biofilme próxima a superfície de contato com o meio aquoso, consomem O_2 em níveis que dificultam a difusão para o interior do biofilme (FLEMMING et al., 2016; MADIGAN et al., 2016).

Desta maneira o aumento de pH pode estar relacionado com a formação de zonas anóxicas no ambiente interno do meio suporte nas fase I e II. Na fase III esse aumento poderia estar relacionado também a própria zona anóxica formada no ambiente de sedimentação da LAF como observado pelo resultado médio de pH 8 no estudo de Pazda (2022).

Os níveis de Oxigênio Dissolvido – OD foram investigadas por medição direta no Oxímetro Lutron DO5519. Para a fase I a média foi correspondente a $7,82 \pm 0,59 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para zona em aeração e $7,21 \pm 0,75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a zona de sedimentação. Os níveis de OD para a zona aerada da LA da fase II (APG + *A. kashmirensis*) foi de $9,49 \pm 1,57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e para zona de sedimentação $7,43 \pm 1,27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para fase III (*A. kashmirensis* não imobilizada) foram obtidas na zona aerada e de sedimentação uma média de $8,25 \pm 0,48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $7,37 \pm 0,99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente.

Associado a este parâmetro foi quantificado o potencial de oxirredução (ORP), a fim de se investigar difusão de oxigênio suplementado nas LAs pelos aeradores. O ORP foi medido tanto na zona aerada quando na zona de sedimentação. Desta maneira, na fase I o potencial da zona aerada foi de $126,50 \pm 2,12 \text{ mV}$ e na zona de sedimentação foi de $116,50 \pm 0,71 \text{ mV}$. Para fase II, na zona de aeração foi quantificado potencial médio de $176,00 \pm 0,01 \text{ mV}$ e na região de sedimentação a média obtida foi de $155,80 \pm 0,01 \text{ mV}$. Para a fase III, o ORP de área em aeração e sedimentação foi de $161,30 \text{ mV} \pm 0,02$ e $149,60 \text{ mV} \pm 0,02$ respectivamente.

Na pesquisa de Nunes (2021), investigando o efluente kraft em tratamento LAF com COV de $0,2 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, obteve para a zona aerada $52,0 \pm 2,80$ e para zona de sedimentação foi de $23,5 \pm 3,50 \text{ mV}$.

O leitor de ORP realizou as leituras em relação ao eletrodo de referência de $+236 \text{ mV}$, especificada pelo fabricante no manual do equipamento. A somatória destes resultados é o valor de potencial redox (Eh) das LAs e suas respectivas fases experimentais, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados de Eh das fases experimentais do estudo.

Fase	Potencial Redox (mV)	
	Zona aerada	Zona aerada
I	362,50	352,50
II	412,00	391,80
III	397,30	385,60

Von Sperling (1996) indica que níveis de potencial redox de $+100$ a $+500 \text{ mV}$ estão associados a um ambiente oxidante e promovem processos aeróbios, tais como a nitrificação.

Faulwetter et al. (2009), estimou os tipos de reações de oxirredução promovidas por microrganismos a partir de resultados de potencial redox obtidos. Segundo o autor valores de 300 a 700 mV indicam a prevalência de respiração aeróbia. Valores de 100 a 350 mV podem estar associados a reações de nitrificação.

Desta maneira, os resultados apresentados na Tabela 6, indicam a prevalência ambientes aeróbios no interior da lagoa. Sendo por esta razão considerada uma lagoa aerada.

Machado (2017) investigando o tratamento de efluente kraft em LAF, encontrou alto potencial de redução ($Eh = 430 \pm 40 \text{ mV}$) na zona aerada, enquanto no sedimento, o Eh foi de $21 \pm 08 \text{ mV}$, configurando uma região facultativa.

A temperatura ambiente obtida durante a operação da fase I correspondeu a uma faixa média de $19 \pm 2,69 \text{ }^\circ\text{C}$ sendo a temperatura máxima de 24°C e mínima de 15°C , por outro lado, durante a atividade operacional das fases II e III a temperatura ambiente correspondeu média de $15 \pm 2,88 \text{ }^\circ\text{C}$; sendo encontrados os valores mínimo de $9 \text{ }^\circ\text{C}$ e máximo de $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

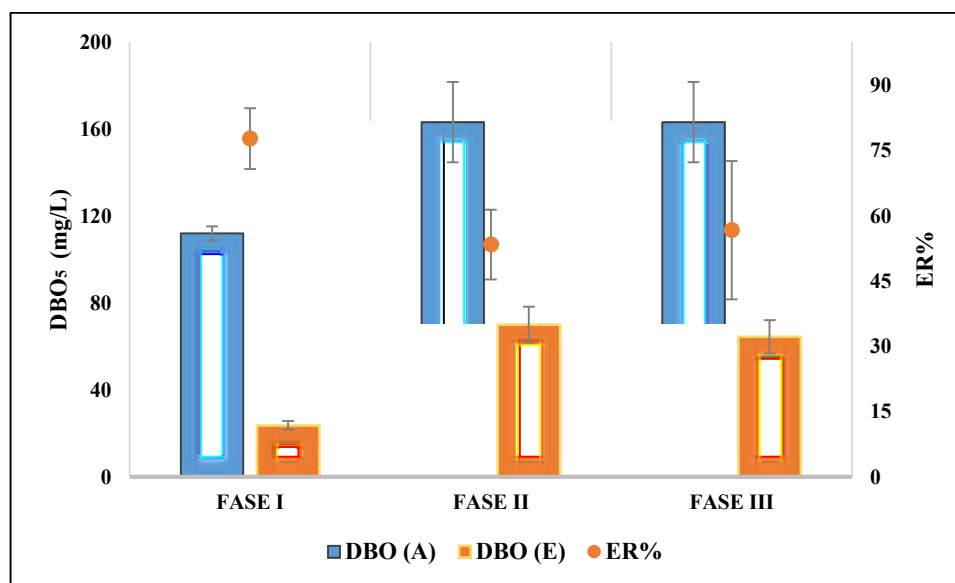
Ghosh e colaboradores (2005), descrevem a faixa de temperaturas toleradas por *A. kashmirensis* como entre 10 a $42 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo sua temperatura ótima 26°C . Desta maneira, as faixas de temperatura encontradas durante a fase II e III possivelmente restringiram a atividade ótima da bactéria em estudo.

5.4 Avaliação da eficiência de tratamento

5.4.1 Remoção de matéria orgânica

O tratamento do efluente de celulose kraft pelo sistema de lagoa aerada foi investigado a partir dos parâmetros DBO₅, DQO e COT. A Figura 12 apresenta os dados de remoção de matéria orgânica DBO₅ obtidos na respectiva pesquisa.

Figura 12. Remoção de matéria orgânica em relação a DBO₅



Os valores de eficiência de remoção de DBO₅ encontrados na fase I do estudo corresponderam a 78%, este foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) da fase II e III, em que as eficiências de remoção encontradas foram de 53 a 57%.

Melchior (2019), analisando o potencial de formação de biofilme em meio suporte APG em reator MBBR para tratar efluente de indústria de celulose, obteve uma média de remoção de 81% na operação do reator por 60d. Segundo a autora, este aumento na eficiência de remoção está relacionado a adaptação e crescimento da biomassa no meio suporte ao longo do tempo, portanto, o biofilme proporcionou maior estabilidade e melhoria em tratamentos biológicos.

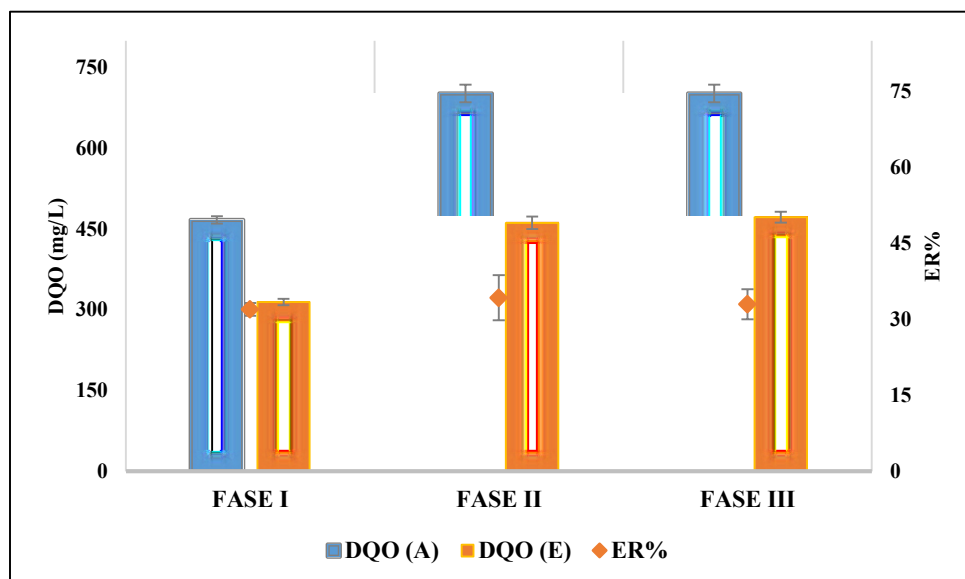
Gandhi et al. (2010), tratando efluente de celulose em reator batelada preenchido com meio suporte PUF (esponja de poliuretano) com biofilme de *Bacillus subtilis* encontrou eficiência de remoção de 81% deste parâmetro ao final do tratamento. Estando, os resultados obtidos no estudo próximo ao esperado em tratamentos biológicos.

A resolução CEMA n°070 de 01 de outubro 2009, em seu anexo 7 estabelece os critérios de padrões de lançamento de efluentes líquidos, onde para a indústria de celulose e papel, a DBO₅ admitida corresponde ao limite de 50 mg.L⁻¹. Para esta pesquisa, apenas o efluente de saída da lagoa da fase I, com concentração média de 24 mg.L⁻¹, atende aos critérios de

lançamento quanto a este parâmetro. Para a fase II a concentração média corresponde a 70 mg.L⁻¹ e para a fase III o total obtido correspondeu a 64 mg.L⁻¹.

Na Figura 13 são apresentados os resultados para remoção de DQO, na fase I, fase II e fase III respectivamente.

Figura 13. Remoção de matéria orgânica em relação a DQO



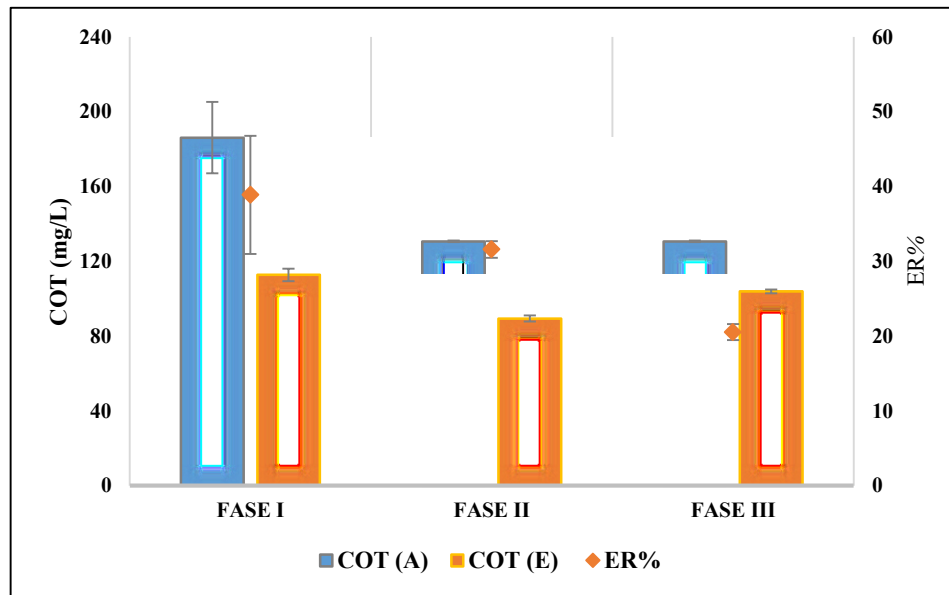
Na Figura 13, se observa que a concentração média de DQO do efluente de entrada na fase I, foi de 467 mg.L⁻¹, onde a eficiência de remoção encontrada foi de 32%. Se constata, que para a fase II e III, em que as lagoas foram alimentadas pela mesma amostra industrial, este apresentava maior concentração de matéria orgânica em termos de DQO em relação a fase I. Esta amostra apresentou concentração média de 702 mg.L⁻¹, sendo sua eficiência de remoção de 34% para a fase II (APG + *A. kashmirensis*) e 33% para a fase III (*A. kashmirensis* livre).

As eficiências de remoção para este parâmetro não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$), entretanto, deve-se considerar que para a fase II e III o afluente apresentava maiores concentrações de matéria orgânica.

Vanzetto et al. (2014), tratando efluente kraft da mesma origem da desta pesquisa, empregando reator MBBR com meio suporte Kaldness K3 obteve eficiência de remoção de 48% de DQO. Dykstra et al. (2015), tratando efluente kraft em lagoa aerada de estabilização com COV de 0,15 kg DQO.m⁻³d⁻¹, encontrou eficiência de remoção de 64% de DQO.

Na Figura 14 são apresentados os resultados da eficiência de remoção do parâmetro Carbono Orgânico Total - COT obtida nas distintas etapas.

Figura 14. Remoção de matéria orgânica em relação ao COT



Na fase I a média de remoção obtida correspondeu ao 39% da COT, para a fase II este total passou para 32% e para a fase III a média obtida foi de 21%. Se constata que estatisticamente não houve diferença entre as fases I e II frente ao potencial de remoção de matéria orgânica a um nível de 95% de confiança.

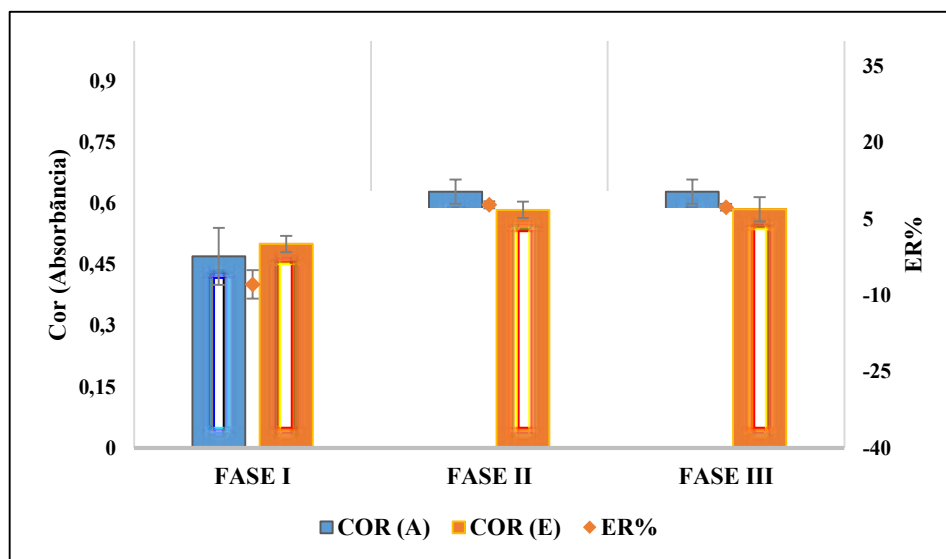
Na pesquisa de Pazda (2022), tratando efluente kraft em lagoa aerada facultativa, com COV de $0,2 \text{ kgDQO.m}^{-3}\text{d}^{-1}$ e com diferentes dosagens de nutrientes, em que a razão de nutrientes era de C:N:P de 100:0,5:0,1, similar ao desta pesquisa, foi obtido um total de 26% de remoção deste parâmetro. Nunes (2021), em que utilizou esta mesma concentração de nutrientes em LAF tratando efluente kraft obteve a média de 45% de remoção de COT também em condições similares de tratamento.

5.3.2 Remoção de compostos específicos, cor, área espectral e turbidez

Nesta seção são representados os dados da remoção de compostos específicos, correspondentes aos compostos fenólicos totais e compostos lignínicos. Como também os parâmetros de cor, turbidez e área espectral.

Na Figura 15 são apresentados a porcentagem de remoção de cor do efluente.

Figura 15. Níveis de remoção de Cor



Para a fase I a média de remoção de cor apresentou um incremento de 9%, para a fase II a remoção foi de 8%, enquanto para a fase III a média obtida correspondeu a 7%. Para este parâmetro se constatou a diferença estatística entre a fase I e as fases II e III, sendo que estas últimas não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

No ensaio de bioaugmentação empregando *Advenella kashmirensis* associado a biomassa em sistema de reator aeróbico de leito móvel (MBBR), os pesquisadores Silva; Couto; Xavier (2021), obtivera um potencial de remoção de 60% da cor.

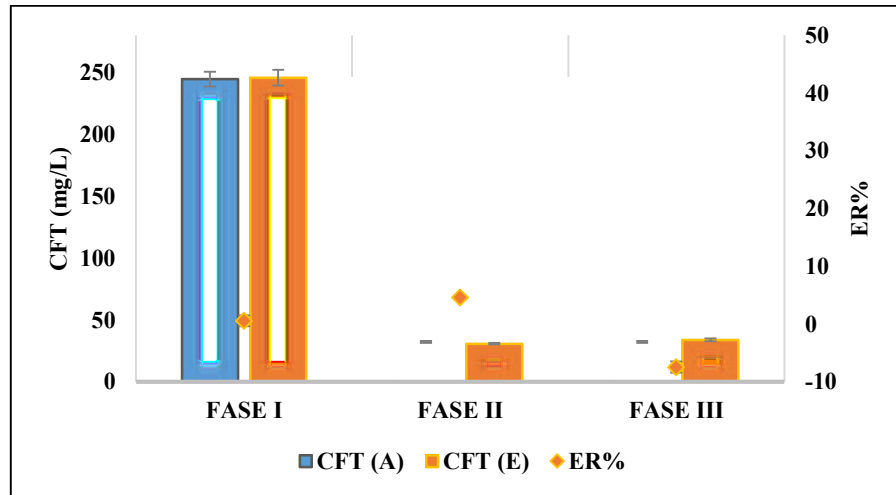
Por outro lado, Peitz (2018) no estudo de tratamento em LAF com meio suporte APG associado a biomassa, observou um incremento de 38% de cor. Segundo a pesquisadora, os níveis de remoção de cor estão associados ao efeito de adsorção de compostos cromóforos, como a lignina e derivados.

Neste caso os níveis de remoção ou incremento de cor potencialmente estão relacionados a estrutura do meio suporte APG, sendo responsável por diminuir os teores pela adsorção dos compostos cromóforos, ou pelo aumento dos teores de cor do efluente quando no interior do meio suporte estão ocorrendo reações em anaerobiose.

Flemming e colaboradores (2016), citam a presença de gradientes funcionais do biofilme, estabelecido pela tendência das porções internas da matriz em tornar-se anóxica pela dificuldade de difusão de oxigênio. Entretanto, o resultado obtido na fase II, de remoção de 7,8%, indicam que apesar da tendência do meio interno do APG ser anóxica houve eficiência de remoção deste composto, o que podem estar associadas ao potencial da bactéria *A. kashmirensis* para o tratamento deste parâmetro, tendo em vista que na fase III, sem meios suporte também houve remoção do composto.

Na Figura 16 são apresentados os resultados das análises do parâmetro compostos fenólicos totais analisados durante o tratamento do efluente de celulose kraft.

Figura 16. Níveis de remoção de CFT

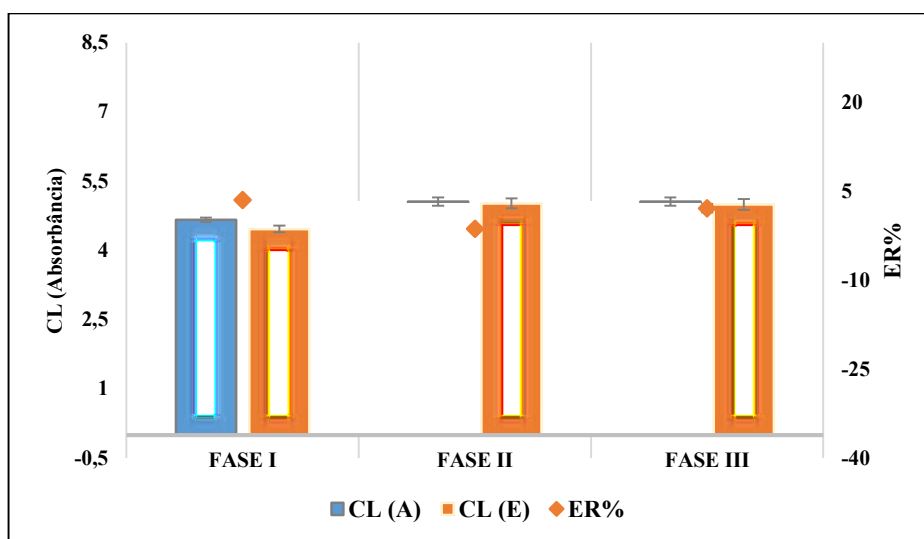


Como apresentado na Figura 16, para compostos fenólicos, a média encontrada de remoção na fase I foi de apenas 1%, para a fase II a eficiência total correspondeu a 5%, e para a fase III foram obtidas um acréscimo deste composto em 7% em relação ao afluente de entrada. Apesar destas diferenças, estatisticamente os resultados não diferiram significativamente a um nível de 95% de confiança.

Pazda (2022), tratando efluente kraft de mesma origem desta pesquisa e com mesmo nível de C:N:P em sistema LAF obteve um índice de remoção de 8% deste composto. Por outro lado, no estudo de Gandhi et al. (2010), tratando efluente em reator de coluna com meio suporte PUF immobilizando *Bacillus subtilis*, encontrou eficiência de remoção de 61% de compostos fenólicos totais.

Na Figura 17 são apresentados os valores médios de remoção dos compostos de lignina.

Figura 17. Níveis de remoção de CL

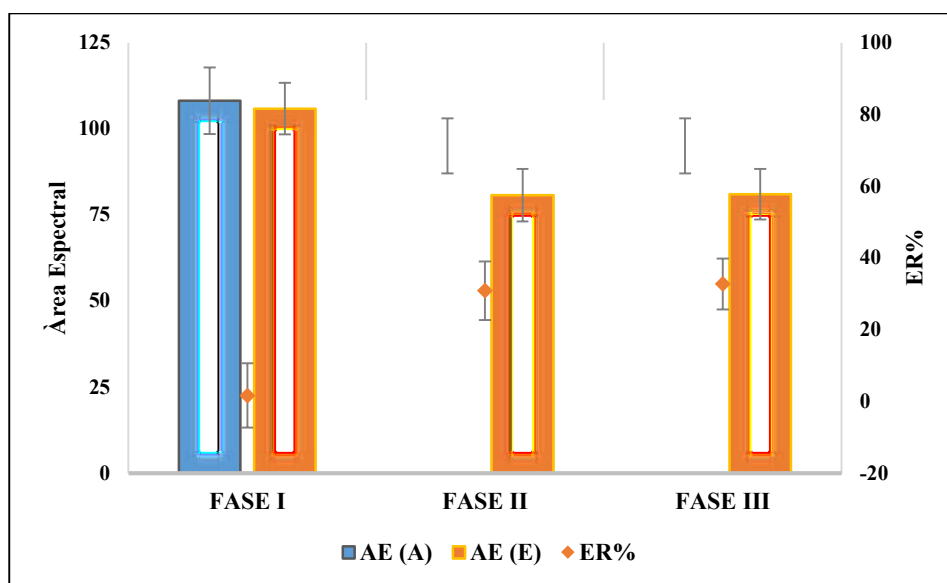


Como apresentado na Figura 17, a média encontrada para remoção de compostos de lignina na fase I foi de 3,51%, para a fase II foi observado um incremento de 1,35% deste composto, já para a fase III a remoção obtida correspondeu a 2,12%. Sendo estatisticamente as três fases, frente aos níveis de remoção deste composto, semelhantes estatisticamente a um nível de confiança de 95%.

Melchior (2019), empregando reator MBBR com meio suporte APG e COV de 0,6 kgDQO.m⁻³d⁻¹, obteve uma média de remoção de lignina de 10%. Enquanto Peitz (2018), tratando efluente kraft em lagoa aerada com meio suporte APG obteve incremento deste composto, em torno de 10%. Chamorro et al. (2009), também observou o incremento de compostos lignínicos durante o tratamento em lagoa aerada.

Milestone e colaboradores (2004), justificam que o incremento de compostos derivados de lignina está relacionado ao tratamento biológico realizado nas LAFs, em que moléculas de alto peso molecular são biotransformadas, podendo se repolimerizar formando novos compostos derivados de lignina. Isto poderia justificar por exemplo o incremento deste composto observado na fase II, mesma fase em que se verificou o tratamento dos compostos fenólicos totais de 5%.

O parâmetro área espectral foi investigado durante as três fases deste estudo, a fim de se investigar o perfil de remoção de compostos absorvedores na região do UV-Vis, como apresentado na Figura 18.

Figura 18. Níveis de remoção de área espectral (AE)

Para a fase I a média obtida na remoção de AE foi de 2%, para a fase II a porcentagem de remoção passou para 31% e para a fase III a média obtida foi de 33%. Frente a estes resultados, observa-se melhores remoções nas etapas da pesquisa em que se empregou a bactéria *A. kashmirensis*.

Os pesquisadores Ogugbue e Sawidis (2011), utilizaram a varredura de área espectral do UV-visível para provar a biodegradação e descoloração de corantes triarilmetano de efluente pela bactéria *Aeromonas hydrophila* isolada das águas residuárias da indústria têxtil. Estes observaram que pico de absorção de luz visível era mais alto na amostra antes do tratamento biológico, fenômeno que se deve, segundo os autores, pela efetiva quebra do corante em metabólitos não absorventes por processo de biodegradação.

Associado a hipótese da biodegradação efetiva de compostos, se verifica na literatura uma associação entre incrementos de compostos derivados de lignina e o tratamento biológico por lagoas aeradas. Segundo estes as macromoléculas de lignina são biotransformadas parcialmente, estas porções de quebra se repolimerizam formando novos derivados lignínicos e fenóis durante o tratamento (LARREA, et al., 1989; MILESTONE et al., 2004; MELCHIORS, 2019; PAZDA, 2022). Desta maneira se observa a tendência da remoção de CL obtidas na fase I correspondente a 3,5%, e de CFT de 1%, estar relacionada a biotransformação das moléculas em novos derivados, visto que a remoção de área espectral foi de apenas 2%.

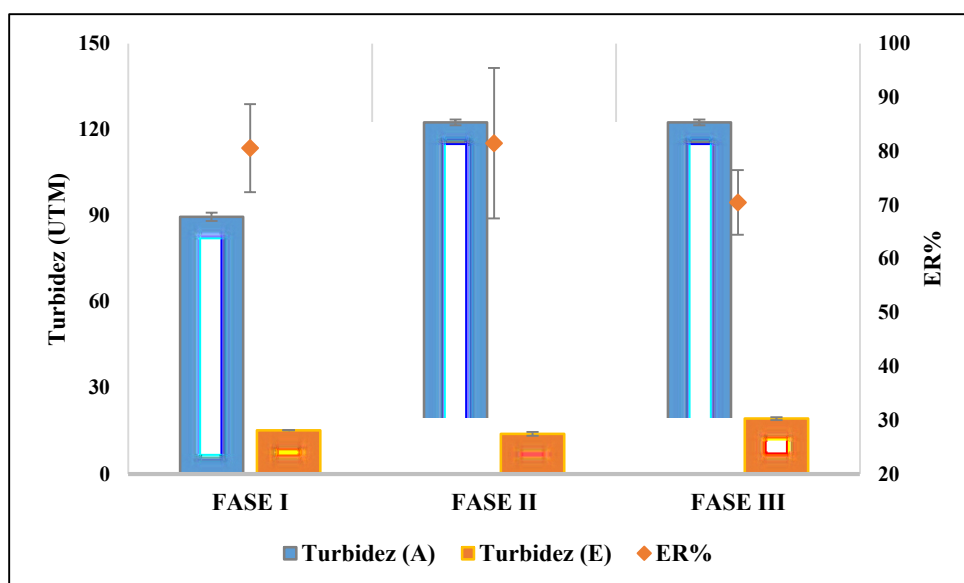
Para a fase II apesar de efetiva remoção de 31% da área espectral, houve incremento de CL ao nível de 1,35%, isto pode estar associado ao potencial da matriz em acumular compostos do meio, estes quando sorvidos podem então ser depreendidos para a fase aquosa, causando

estes incrementos, que então segundo Larrea, et al. (1989) pela aeração do sistema, podem estar sendo biotransformados em compostos com grupo fenol, que sobre esta forma foram removidos.

Para a fase III há uma efetiva remoção de 33% da área espectral do efluente, sendo um indicativo do potencial da bactéria *A. kashmirensis* em efetivamente degradar compostos recalcitrantes, independente se ativa sob a forma de vida livre ou aderida.

Na Figura 19 são apresentados os potenciais de remoção de turbidez dos sistemas LAs.

Figura 19. Níveis de remoção de turbidez

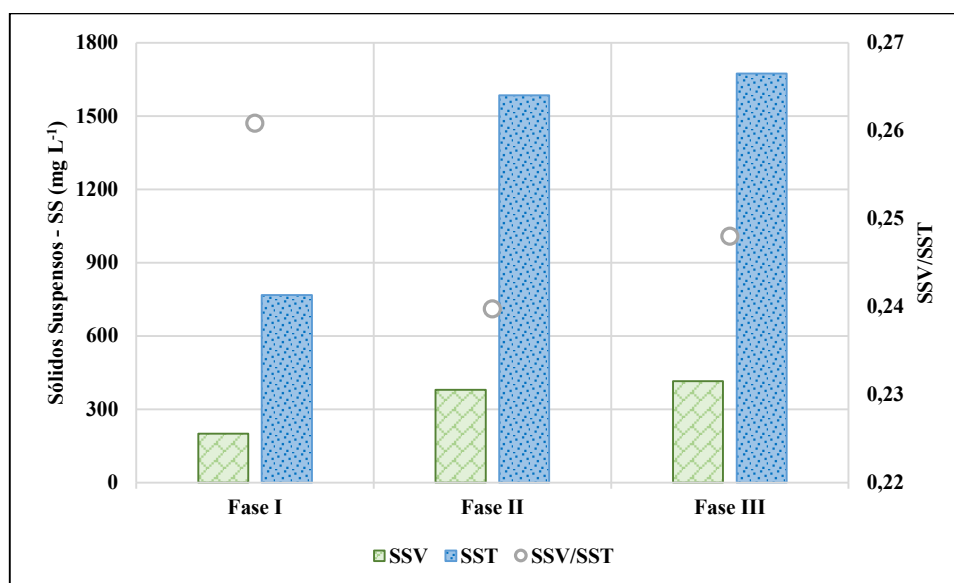


Para a fase I e fase II a eficiência de remoção de turbidez foi de 81%, para a fase III a média de remoção decresceu para 70%, os resultados obtidos indicam o potencial de remoção de turbidez pelo emprego do meio suporte APG.

Melchior (2019) encontrou eficiência de remoção de turbidez aos níveis de 92% e 79%. Segundo a autora emprego do sistema MBBR com meio suporte APG apresentou potencial para tratamento de efluentes com elevada turbidez, o que naquele caso dispensou o uso de decantados secundário.

Nunes (2021), obteve um total de remoção de turbidez de 94% em sistema LAF com COV de $0,2 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, vale ressaltar que para este tratamento a pesquisadora empregou afluente com DQO média de $440,89 \text{ mg L}^{-1}$. Já para esta pesquisa os níveis de DQO para a fase I correspondiam a $515,68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e para fase II e III foram de $952,11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

A Figura 20 a seguir apresenta os perfis de concentração de sólidos durante as fases da pesquisa.

Figura 20. Sólidos suspensos nas lagoas aeradas

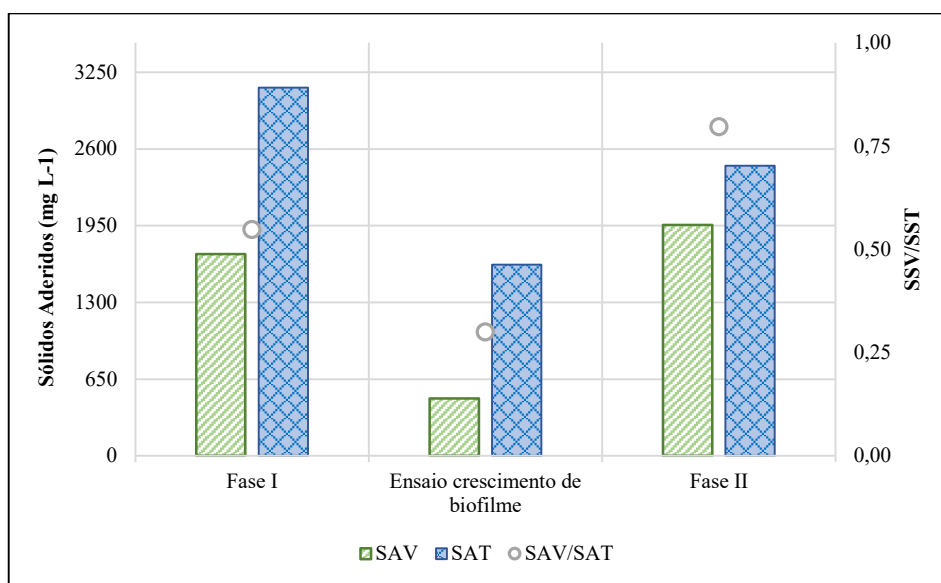
Para a fase I, concentração de SSV foi de 200 mg.L⁻¹. Para a fase II e III, em que se adicionou as LAs a bactéria *A. kashmirensis* a concentração aumentou para 380 e 415 mg.L⁻¹ respectivamente. O teor de SST para a fase I foi de 766 mg.L⁻¹, para a fase II foi 1585 mg.L⁻¹ e para a fase III foi de 1673 mg.L⁻¹. Com este resultado, foi calculada a razão SSV/SST das amostras que corresponderam a 0,26, 0,24 e 0,25 para a fase I, II e III respectivamente.

Von Sperling (2014) atribui a relação SSV/SST a tendência de estabilização do lodo, sendo que valores menores indicam maiores tendências de estabilização da biomassa associada a altas idades de lodo que na lagoa foi maior que 50 d.

Os resultados da fase I foram aproximados ao observado por Melchioris (2019) em experimento tratando o efluente kraft em reator MBBR com meio suporte APG, em que a concentração de SSV foi de 180 mg.L⁻¹ após 60 dias de operação do sistema.

Nunes (2021), encontrou concentrações de 770 mg.L⁻¹ em termos de SSV, e também 1181 mg.L⁻¹ de SST, que originaram uma razão SSV/SST média de 0,67 após 60 dias de operação da lagoa.

A Figura 21 apresenta a concentração de sólidos retidos no meio suporte APG durante as fases da pesquisa.

Figura 21. Teores de Sólidos Aderidos

A Figura 21 apresenta os teores de sólidos aderidos nas unidades do APG da lagoa aerada ao final de cada fase do experimento. Para a fase I, em que as 90 unidades de APG foram adicionadas a lagoa que continha 70 mgSSV.L⁻¹ de biomassa proveniente do lodo da indústria, ou seja, sem a realização de uma imobilização prévia e inoculação da bactéria autóctone, foram encontrados um total de 1710 mg.L⁻¹ SAV retidos nos APGs e uma média de 3120 mg.L⁻¹ de SAT, que originaram uma relação SAV/SAT de 0,55 mg.L⁻¹ que indicaram um lodo menos estabilizado que aquele disperso na lagoa. Para a fase II, onde as unidades de APG foram previamente imobilizadas com biofilme de *A. kashmirensis* durante 21 dias antes de sua adição a lagoa foi obtido um total de SAV de 1960 mg.L⁻¹ e SAT de 2460 mg.L⁻¹, que promoveu um SAV/SAT de 0,80, ou seja, a porcentagem orgânica do lodo é de cerca de 80%, que pode ter sido justificado pela adição da bactéria imobilizada em concentração potencialmente maior do que sua presença na biomassa do lodo da indústria, onde a mesma foi isolada.

O item “ensaio de crescimento de biofilme”, foi originário do ensaio de imobilização a 21 dias da bactéria para inoculação do APG com biofilme aderido na lagoa da fase II. Neste ensaio foi obtido uma SAV de 490 mg.L⁻¹; SAT de 1620 mg.L⁻¹ e SAV/SST de 0,30. Os resultados foram utilizados para avaliar a presença de biofilme imobilizado da bactéria no meio suporte após dos 21 dias do ensaio de formação de biofilme no APG.

Melchior (2019) investigou os sólidos aderidos ao meio suporte APG usados em reator MBBR, a pesquisadora obteve para a COV de 0,6 kgDQO.m⁻³d⁻¹ uma média de SAV de aproximadamente 700 mg.L⁻¹. A razão SAV/SAT variou entre 0,8 e 0,6, indicando que após os quatro bimestres de operação do MBBR-APG a biomassa estava sendo formada e estabilizada

no meio suporte.

Os valores apresentados nas Figuras 20 e 21, possibilitam inferir a dinâmica do lodo nas lagoas, onde se constata a prevalência de biomassa sob a forma aderida aos meios suportes em relação as suspensas ao efluente. Resultado que pode estar relacionado a capacidade do meio suporte em proporcionar proteção a condições desfavoráveis, como expressos por Barwal e Chaudhary (2014).

Elevadas taxas de oxigênio dissolvido por exemplo, podem originar as espécies reativas de oxigênio (ROS), estas se configuram como fatores estressantes pela capacidade de modificar e danificar macromoléculas celulares, como RNA, DNA, proteínas e lipídios, que a longo prazo afeta o metabolismo dos microrganismos e pode resultar em toxicidade e lise celular (FASNACHT, POLACEK; 2021; SEIXAS et al., 2022).

Nesta pesquisa, este estresse oxidativo pode ter sido originado pelos índices de oxigênio dissolvido obtidos, que estiveram em uma faixa de 7,21 a 9,49 mg.L⁻¹. Oliveira e colaboradores (2012), apontam que níveis superiores a 3,0 mg.L⁻¹ são eficientes para aeração de reatores do tipo aeróbio.

Portanto, os meios suportes imersos na lagoa potencialmente proporcionaram proteção fontes de ROS, e possibilitaram o desenvolvimento de biofilme na fase I e fase II, do que em comparação a fase III.

5.4 Análise estatística da eficiência de tratamento

A partir dos parâmetros investigados durante a pesquisa, foram avaliadas as médias de remoção obtidas no tratamento do efluente kraft através do sistema de lagoa aerada com emprego de meio suporte APG (fase I); APG com biofilme aderido de *A. kashmirensis* (fase II); e bactéria *A. kashmirensis* sob a forma livre (fase III). Para investigar as eficiências de cada fase ao potencial tratamento dos compostos, foi utilizado o software Statistica 14.0.0.15 para análise de variância ANOVA – Tukey, após verificação da normalidade dos dados e seus resultados estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7. Análise estatística dos tratamentos

Remoção (%)	DQO	DBO	COT	CFT	CL	COR	TURBIDEZ
Fase I	32 ^a	78 ^a	39 ^a	1 ^a	4 ^a	-9 ^b	81 ^a
Fase II	34 ^a	55 ^b	31 ^a	5 ^a	-1 ^a	8 ^a	81 ^a
Fase III	33 ^a	60 ^b	21 ^b	7 ^a	2 ^a	7 ^a	70 ^a

Nota: (a; b) Letras iguais, amostras do mesmo grupo sem diferença entre as médias; letras diferentes, grupos com médias diferentes (p<0,05). * o símbolo “-” representa incrementos do parâmetro analisado.

Frente aos resultados apresentados se verifica que entre tratamentos, a fase I em que se utilizou o APG associado a biomassa se constatou eficiências de remoção para matéria orgânica global e turbidez. Mas na fase II e III em que ocorreu a bioaumentação de *A. kashmirensis* aderida ou livre foi eficiente para remover compostos específicos, considerados recalcitrantes ao sistema de tratamento de lagoa aerada.

Dentre as fases com a bactéria autóctone inoculada, considera-se a fase II mais eficiente pois possibilitou além do tratamento dos compostos recalcitrantes, o crescimento e adesão de microrganismos potencializando a resistência destes as condições desfavoráveis do efluente.

5.4.1 Análise comparativa das eficiências de tratamento

A Tabela 8 a seguir apresenta as eficiências de remoção obtidas nas fases de tratamento do efluente kraft, e a comparação destes com os resultados encontrados na literatura.

Tabela 8. Análise comparativa de eficiências de tratamento

Parâmetro	Meio de suporte		Bactéria imobilizada		Adição de bactéria livre		
	Fase I ¹	LA-APG ²	Fase II ³	Meio suporte + bactéria ⁴	Fase III ⁶	LAF 100:0,5:0,1 ⁷	LAF ⁸
DQO	32	38	34	76	33	36	65
DBO ₅	78	83	53	81	57	82	95
COT	39	-	32	-	21	-	-
CFT	1	-115	5	61	-7	8	48
CL	3	-19	-1	65	2	4	-
Cor	-8	1	8	-	8	-3	-

Nota: Autores: 1 – Neste trabalho fase I; 2 - Peitz (2018); 3 – Neste trabalho fase II; 4 - Gandhi; Udayasoorian; Meda (2010); 6- neste trabalho fase III; 7 – Pazda (2022); 8 – Chamorro et al. (2009).
* o símbolo “-” representa valores de incremento do parâmetro analisado.

A partir dos resultados apresentados para a Fase I, II e III, é possível inferir que o ensaio da fase I apresentou maior potencial para remoção de parâmetros de matéria orgânica global. Por outro lado, compostos específicos, que são considerados recalcitrantes, foram removidos na fase II e III, em que há a bioaumentação com *A. kashmirensis*, resultados que podem nortear novos ensaios, em especial para seleção de espécies autóctones para remoção de compostos específicos.

Sob a forma de vida, a partir dos resultados observados no estudo de sólidos suspensos e aderidos, é possível confirmar que o meio suporte foi essencial para a sobrevivência da biomassa, portanto, o modo de vida do tipo biofilme proporciona potenciais melhorias em tratamento biológico e estabilidade frente a condições adversas ao longo do tempo, configurando uma alternativa de melhoria potencialmente promissora ao tratamento industrial.

Frente aos resultados da literatura, o tratamento do efluente na fase I desta pesquisa se

apresentou mais eficiente para remoção de compostos recalcitrantes, como CFT e CL, entretanto a cor apresentou acréscimos em relação ao encontrado por Peitz (2018).

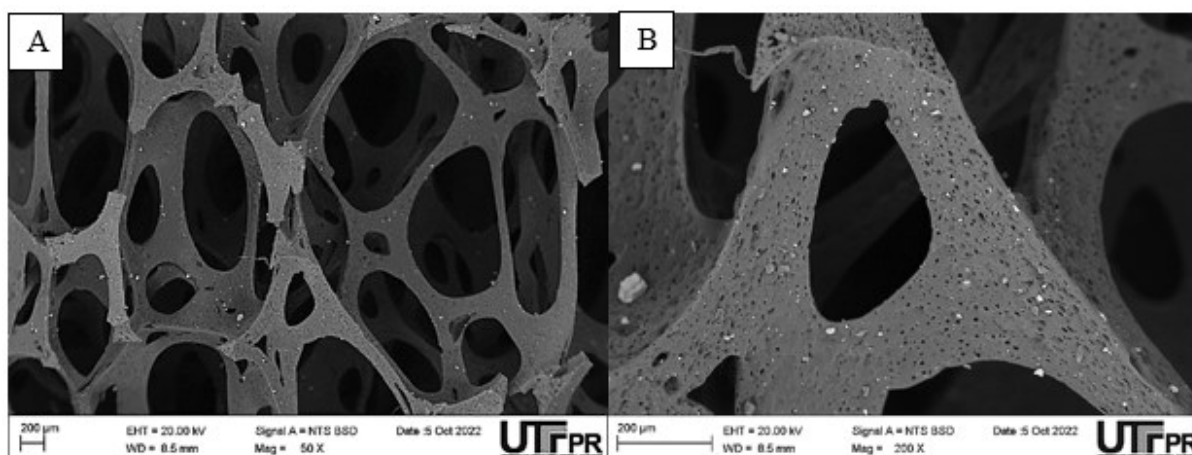
Quanto a fase II, referente a adição do APG imobilizado com *A. kashmirensis* em lagoa aerada, os dados foram comparados de Gandhi e colaboradores (2010), tratando efluente de celulose em reator batelada preenchido com meio suporte de poliuretano imobilizado com *Bacillus subtilis*, em que o tratamento do efluente foi superior ao observado nesta pesquisa.

Para a fase III, correspondente a adição de *A. kashmirensis* em forma de vida planctônica, se observa que os índices de remoção de DQO e lignina foram próximos aos obtidos em ensaios de lagoa aerada com biomassa tratando efluente kraft. Os índices de remoção de cor foram mais eficientes, que os encontrados em outros trabalhos. Entretanto, em comparação aos resultados obtidos por Chamorro et al. (2009), se constata a menor eficiência no geral. Novamente se ressalta a hipótese de que as baixas temperaturas nas fases II e III afetaram o tratamento do efluente.

5.5 Análise dos biofilmes no suporte esponjoso por Microscopia Eletrônica de Varredura

Na figura 22 são apresentadas as micrografias do meio suporte esponjoso APG, a fim de verificar suas estruturas superficiais e internas.

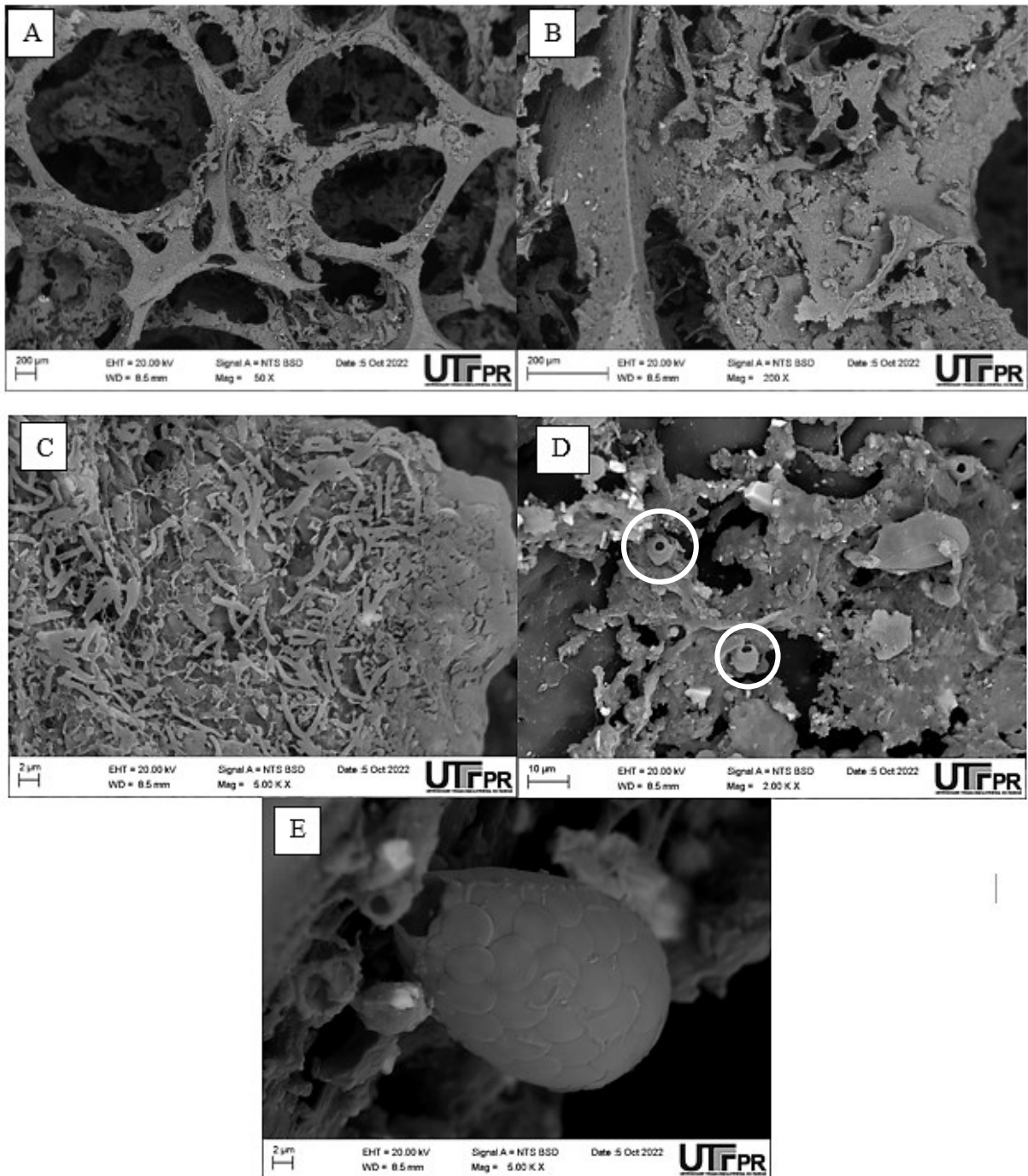
Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do meio de suporte APG antes do uso



Na Figura 22, pode-se verificar a estrutura tridimensional interna do APG e vários poros com a presença de paredes internas que são necessárias como superfície de adesão para o crescimento de microrganismos e biofilme. Subsangan (2020) cita que a área superficial do meio APG pode alcançar $3000 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$. Na figura A se observa a estrutura interna do APG em aumento de 50X; a figura B corresponde ao aumento de 200X da amostra.

Na Figura 23 são apresentadas as MEVs do APG após 46 dias de operação da fase I.

Figura 23. Micrografia do meio de suporte APG da fase I



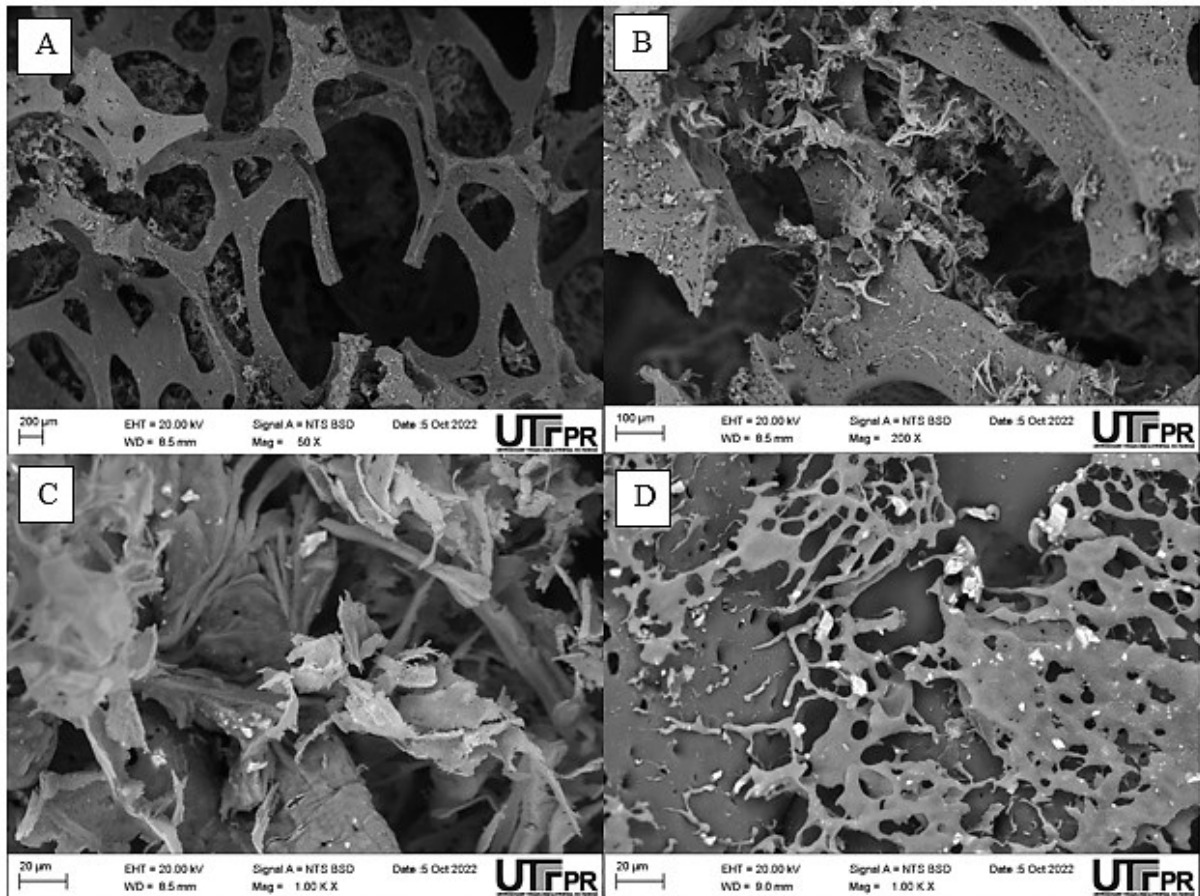
Pelas imagens pode ser verificada a adesão de biofilme ao APG. Pela figura 24 A (aumento de 50X) e B (aumento 200X), é possível verificar que a biomassa não cobriu totalmente os poros o que pode ser devido a difusão facilitada em menores superfícies de contato, ao mesmo tempo que permite a passagem do efluente e consequentemente níveis de oxigênio ao interior do meio suporte. Na figura C é possível verificar uma área estratificada no APG em que ocorreu o crescimento de bactérias e de matriz EPS, correspondente aos filamentos

entre os indivíduos como observado por Trentin; Giordani e Macedo (2013). Nas imagens MEV das figuras D e E, é possível observar estruturas que se assemelham às observadas para fungos filamentosos e suas estruturas reprodutivas especializadas e denominadas de conídio, que por adesão a um substrato são germinadas originando hifas (AOR et al., 2018).

Aor e colaboradores (2018), citam a hipótese de que estas estruturas correspondem as etapas iniciais para a construção de uma estrutura de biofilme complexa e robusta.

Na Figura 24, pode-se verificar a estrutura do biofilme de *A. kashmirensis* ao APG e as estratégias de adesão aos poros do meio suporte após 21 dias do ensaio de imobilização.

Figura 24. Micrografia do suporte APG com biofilme de *A. kashmirensis*



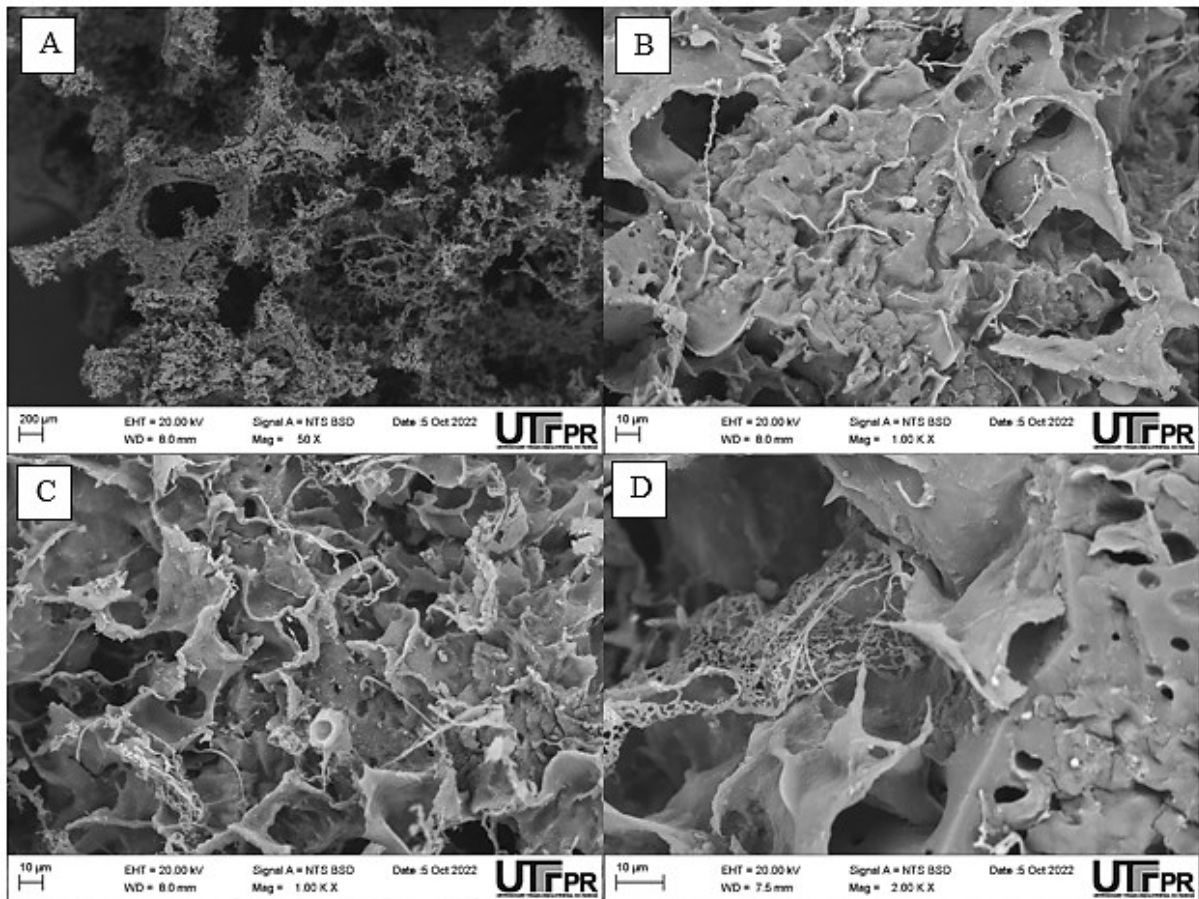
Na figura 24 A é possível verificar que o biofilme de *A. kashmirensis* se aderiu as paredes do suporte APG sem coalmar os poros, isso pode ter facilitado a imersão de nutrientes e oxigênio para o biofilme aderido. Na figura 24 B e C, se verificam as projeções da matriz do biofilme. Há uma relação benéfica em estruturas de biofilme menos espessos e projetados, em que devido as maiores interfaces líquido-biofilme a adsorção de moléculas e difusão de nutrientes no interior de canais de fluxo de massa líquida é facilitada (CHAVES, 2004; KRSMANOVIC et al. 2021).

Enquanto na imagem D, se constata que o biofilme desta região apresenta menores projeções e uma constituição mais espessa, possivelmente correspondendo a áreas de fixação ao exterior do meio APG.

A literatura indica que forças de tensão e turbulências no meio aquoso podem afetar a estrutura física dos biofilmes, por exemplo, quando velocidades de escoamento da água se apresentam elevadas há uma tendência da arquitetura do biofilme tornar-se mais densas e coesas para evitar o desprendimento de biofilme (CHAVES, 2004; TSAGKARI; SLOAN, 2018).

Na Figura 25 são apresentadas as MEVs do APG após 63 dias de operação da lagoa aerada.

Figura 25. Micrografia do APG da fase II



Se constata que para a fase II as paredes do APG, como apresentadas na figura 25 A, foram amplamente colonizadas no interior do sistema de tratamento, tendo em vista a maior adesão de biofilmes nos espaços dos poros. Se ressalta que o APG desta etapa inicialmente passou por imobilização da bactéria *A. kashmirensis*, sendo posteriormente adicionada a lagoa, desta forma se constata que a biomassa do lodo da lagoa também pode ter se associado no meio suporte, como observado nas imagens B, C e D, em que se verificam diferentes formatos de

biofilmes aderidos, mas sem evidente estratificação de um determinado grupo microbiológico em uma região específica. Na imagem C, também é possível verificar a presença de um conídio, indicando a presença de fungos filamentosos na interface ao APG.

Chaves (2004) cita a enorme diversidade de espécies que podem estar presentes nos biofilmes, sendo frequentemente encontrados microalgas, fungos, protozoários e bactérias. O que é desejável, uma vez que a presença de diferentes grupos metabólicos de microrganismos, e suas diversas reações químicas favorece mecanismos de tratamento de águas residuárias (ORTEGA et al., 2001).

De forma geral, é possível observar que durante as operações das lagoas da fase I e fase II, o APG proporcionou área de adesão para formação de uma matriz de biofilme bastante diversa, constituída de bactérias e fungos. Como também correspondeu a suporte capaz de imobilizar a espécie bacteriana autóctone *Advenella kashmirensis*.

Melchior (2019) após 240 dias de operação de reator MBBR-APG tratando efluente kraft do efluente da indústria de celulose e papel na presença de biomassa da própria empresa de mesma origem da desta pesquisa, também constatou a diversidade de bactérias fungos e EPS aderidos ao meio suporte. Segundo a autora, os poros do meio suporte APG mantiveram-se abertos, uma característica que favoreceu o desempenho do tratamento biológico do efluente.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi avaliado o desempenho do tratamento de efluente de celulose kraft por sistema de lagoa aerada modificada pela bioaugmentação da espécie bacteriana *Advenella kashmirensis*. Foi realizada a investigação frente aos níveis de remoção de matéria orgânica global e compostos específicos durante as três fases de ensaio, em que se investigou a tratabilidade pela adição de meio suporte APG; a adição de *Advenella kashmirensis* como biofilme aderido ao APG e a bactéria *Advenella kashmirensis* sob a forma planctônica em sistemas independentes (ou individuais) de lagoas aeradas.

A remoção de DQO não diferiu estatisticamente entre as fases, onde se obteve um percentual de remoção de 32%, 34% e 33% para as fases I, II e III respectivamente. Se constatou que a remoção de DBO₅, foi considerada mais eficiente na fase I em que se empregou o APG para desenvolvimento do biofilme da biomassa presente da lagoa, para este se obteve 78% de remoção. Enquanto que a melhores eficiências de remoção de COT foram constatadas nas fase I e fase II, correspondentes a 39% e 32% respectivamente. Se constatou a remoção de compostos específicos nas fases II e III, em que ocorreu a bioaugmentação da bactéria.

As análises MEV constataram a presença de biofilme no meio suporte esponjoso, e que a *A. kashmirensis* cresceu como biofilme, metabolicamente ativo como analisado nos ensaios de emissão de fluorescência.

Em termos gerais, pode se afirmar que *A. kashmirensis* favoreceu o tratamento dos compostos específicos como CFT, cor e área espectral do efluente, sendo viável para a remoção destes componentes frequentemente apontados como de recalcitrância, sendo portanto uma alternativa viável e inovadora para o tratamento do efluente da indústria.

Como proposta para trabalhos futuros se sugere investigar a imobilização em outros tipos de meio suportes comerciais, tendo em vista que as dimensões dos poros podem influir na difusão de oxigênio, a fim de diminuir zonas anaeróbias. Além disto, um sistema com temperatura controlada ao nível ótimo da espécie pode promover que a bactéria esteja metabolicamente mais ativa, sendo mais eficiente ao tratamento.

7. REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 9898: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**. Rio de Janeiro, 1987.

ABTCP - **Associação Brasileira Técnica de Papel e Celulose** (O Setor). Disponível em: <www.abtcp.org.br/quem-somos/osetor/o-setor. Acessado em 15/12/2020>.

AHMADI, M.; ALIAN, A. M.; AMIRI, H.; RAMAVANDI, B.; IZANLOO, H. Upgrading of Kish Island Mirmohana Wastewater Treatment Plant using Moving Bed Biofilm Reactor Alternative. **Iranian Journal of Health Sciences**. Vol. 2, p. 33-42, 2014.

AOR, A. C.; MELLO, T. P.; SANGENITO, L. S.; FONSECA, B. B.; ROZENTAL, S.; LIONE, V. F.; VEIGA, V. F.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Ultrastructural viewpoints on the interaction events of *Scedosporium apiospermum* conidia with lung and macrophage cells. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Vol. 113(10), 2018.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington: American Public Health Association, 2017.

ASHRAFI, O.; YERUSHALMI, L.; HAGHIGHAT, F. Wastewater treatment in the pulp-and-paper industry: A review of treatment processes and the associated greenhouse gas emission. **Journal of Environmental Management**, Vol. 158, p. 146-157, 2015.

BACDIVE - ID 383 *Advenella kashmirensis*. Disponível em: <[doi:10.13145/bacdive383.20211221.6](https://doi.org/10.13145/bacdive383.20211221.6)>. Acesso em: 26 de setembro de 2022.

BAJPAL, P. **Environmentally Friendly Production of Pulp and Paper**. New Jersey, USA: John Wiley e Sons; 2010.

BANERJEE, P.; BARMAN, S. R.; SWARNAKAR, S.; MUKHOPADHYAY, A.; DAS, P. Treatment of textile effluent using bacteria-immobilized graphene oxide nanocomposites: evaluation of effluent detoxification using *Bellamyia bengalensis*. **Clean Technologies and Environmental Policy**. Vol. 20, p. 217–229, 2018.

BARWAL, A.; CHAUDHARY, R. To study the performance of biocarriers in moving bed biofilm reactor (MBBR) technology and kinetics of biofilm for retrofitting the existing aerobic treatment systems: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. Vol. 13, p. 285–299, 2014.

BAYAT, Z.; HASSANSHAHIAN, M.; CAPPELLO, S. Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: A mini review. **The Open Microbiology Journal**, Vol. 9, p. 48-54, 2015.

BELMONTE, M.; XAVIER, C.; DECAP, J.; MARTINEZ, M.; SIERRA-ALVAREZ, R.; VIDAL, G. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 135, p. 256–263, 2006.

BERNI, M. D.; BAJAY, S. V.; GORLA, F. D. **Oportunidades de eficiência energética para a Indústria. Relatório Setorial Setor Papel e Celulose**. Brasília – 2010. Acessado em 16/12/2020. Disponível em: <

http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo_24/2012/09/06/262/20121127151918797445a.pdf>.

BMG LABTECH – **Fluorescence intensity**. Disponível em: <<https://www.bmglabtech.com/en/fluorescence-intensity/>>. Acesso em 10 de outubro de 2022.

BOGUNIEWICZ-ZABŁOCKA, J.; KŁOSOK-BAZAN, I. Sustainable processing of paper industry water and wastewater: a case study on the condition of limited freshwater resources. **Polish Journal of Environmental Studies**. Vol. 29, No. 3, p. 2064-2070, 2020.

BOMBARDI, F. M. L et al. Spectral monitoring of the growth dynamics of *E. coli* bacterial populations in water environment. **26th International Conference on Optical Fiber Sensors**. OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2018), paper WF43.

BRAMHACHARI, P. V.; REDDY, D. R. S.; KOTRESHA, D. Biodegradation of catechol by free and immobilized cells of *Achromobacter xylosoxidans* strain 15DKVB isolated from paper and pulp industrial effluents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Vol. 7, p. 36–44, 2016.

CABRERA, M. N. Capítulo 7: Pulp Mill Wastewater: Characteristics and treatment. In: FAROOQ, R.; AHMAD, Z. **Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery**. IntechOpen, p. 256, 2017.

CAI, F.; LEI, L.; LI, Y. Different bioreactors for treating secondary effluent from recycled paper mill. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 49–56, 2019.

CAMPOS, E. S.; FOELKEL, C. **A evolução tecnológica do setor de celulose e papel no Brasil**. ABTCP – Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel. São Paulo, Brasil, 2016.

ÇEÇEN, F. The use of UV-VIS measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents. In Conference Proceedings – **7th International Water Association Symposium on Forest Industry Wastewaters**, Seattle- Washington, USA, 2003.

CHAKRABORTY, D.; SHELVAPULLE, S.; REDDY, K. R.; KULKARNI, R. V.; PUTTAIAHGOWDA, Y. M.; NAVEEN, S.; RAGHU, A. V. Integration of biological pre-treatment methods for increased resource replace resource with energy recovery from paper and pulp biosludge. **Journal of Microbiological Methods**. Vol. 160, p. 93–100, 2019.

CHAMORRO S.; XAVIER C. R.; HERNÁNDEZ V.; BECERRA J.; VIDAL, G. Aerobic removal of stigmaterol contained in kraft mill effluents. **Electronic Journal of Biotechnology**. Vol. 12(2), p. 1-7, 2009.

CHAMORRO, S.; XAVIER, C. R.; VIDAL, G. Behavior of aromatic compounds contained in kraft mill effluents treated by an aerated lagoon. **Biotechnology**. Vol. 21, p. 1567–1571, 2005.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável**. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Portugal, 2004.

DALECKI, A. G.; CRAWFORD, C. L.; WOLSCHEHNDORF, F. Targeting biofilm associated staphylococcus aureus using resazurin based drug-susceptibility assay. **Journal of Visualized Experiments**. Vol 111, May 2016.

DEL RIO, D. D. F.; SOVACOO, B. K.; GRIFFITHS, S.; BAZILIAN, M.; KIM, J.; FOLEY, A. M.; ROONEY, D. Decarbonizing the pulp and paper industry: A critical and systematic review of sociotechnical developments and policy options. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Vol.167, p. 1-29, 2022.

DINAMARCA, M. A.; IBACACHE-QUIROGA, C.; BAEZA, P.; GALVEZ, S.; VILLARROEL, M.; OLIVERO, P.; OJEDA, J. Biodesulfurization of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption. **Bioresource Technology**. Vol. 101, p. 2375–2378, 2010.

DINAMARCA, M. A.; ROJAS, A.; BAEZA, P.; ESPINOZA, G.; IBACACHE-QUIROGA, C.; OJEDA, J. Optimizing the biodesulfurization of gas oil by adding surfactants to immobilized cell systems. **Fuel**. Vol. 116, p. 237–241, 2014.

DONEUX, T.; BOUFFIER, L.; GOUDEAU, B.; ARBAULT, S. Coupling electrochemistry with fluorescence confocal microscopy to investigate electrochemical reactivity: A case study with the resazurin-resorufin fluorogenic couple. **Analytical Chemistry**, Vol. 88, p. 6292–6300, 2016.

DRIESSCHE, F. V. D.; RIGOLE, P.; BRACKMAN, G.; COENYE, T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. **Journal of Microbiological Methods**. Vol. 98, p. 31–34, 2014.

DUAN, J.; LIANG, J.; WANG, Y.; DU, W.; WANG, D. Kraft lignin biodegradation by *Dysgonomonas* sp. WJDL-Y1, a new anaerobic bacterial strain isolated from sludge of a pulp and paper mill. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. Vol. 26, p. 1765–1773, 2016.

DYKSTRA, C. M.; GILESA, H. D.; BANERJEE, S.; PAVLOSTATHIS, S. G. Fate and biotransformation of phytosterols during treatment of pulp and paper wastewater in a simulated aerated stabilization basin. **Water Research**. Vol. 68, p. 589–600, 2015.

FASNACHT, M.; POLACEK, N.; Oxidative stress in bacteria and the central dogma of molecular biology. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, Article 671037, 2021.

FAULWETTER, J. L.; GAGNON, V.; SUNDBERG, C.; CHAZARENC, F.; BURR, M. D.; BRISSON, J.; CAMPER, A. K.; STEIN, O. R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. **Ecological Engineering**, Vol. 35, p. 18, 2009.

FIGUEIREDO, P. C. **Construção de uma ferramenta para avaliação de desempenho ambiental de empresas do setor de celulose**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Administração, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal – SP, 77p., 2018.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. Vol. 8, p. 623–633; 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**. Vol. 14, p. 563–575, 2016.

GANDHI, M. S.; UDAYASOORIAN, C.; MEDA, V. Biological treatment of pulp and paper mill effluent using immobilized *Bacillus subtilis*. **International Journal of Biological**

Sciences. Vol. 1, p. 131-140, 2010.

GAUTO, M; ROSA, G. **Química Industrial**. Porto Alegre: Editora Bookman, 283p., 2013.

GHOLAMI, M.; GHANEIAN, M. T.; TEIMOURI, F.; EHRAMPOUSH, M. H.; NADOUSHAN, A. J.; JAMBARSANG, S.; MAHVI, A. H. Indigenous bacteria as an alternative for promoting recycled paper and cardboard mill wastewater treatment. **Scientific Reports** | Nature Portfolio, v. 12, 2022.

GHOSH, W.; BAGCHI, A.; MANDAL, S.; DAM, B.; ROY, P. *Tetrathio bacter kashmirensis* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing, facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Vol. 55, p. 1779–1787, 2005.

GIBELLO, A.; VELA, A. I.; MARTÍN, M.; BARRA-CARACCILO, A.; GRENNI, P.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. Reclassification of the members of the genus *Tetrathio bacter* Ghosh et al. 2005 to the genus *Advenella* Coenye et al. 2005. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Vol. 59, 1914–1918, 2009.

HAO, W-J.; UM, J.; LI, Y. Isolation and identification of high efficient oil-degrading bacteria and formulation of complex bacteria. **Applied Mechanics and Materials**. Vol. 316, 594-598, 2013.

HASAN, H. A.; ABDULLAH, S. R. S.; WHAYAB, N. A. S. B.; ZAINUDIN, F. M.; YUSOF, M. F. M. Design of supporting media for growth of biofilm in treating industrial wastewater. **Indian Journal of Science and Technology**, Vol. 9(21), June 2016.

HEROSO, L. F. **Medidor digital de ORP e pH para auxílio no tratamento de efluentes**. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso do Programa de Graduação em Engenharia de Computação - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

HEWITT, L. M.; KOVACS, T. G.; DUBÉ, M. G.; McLATCHY, D. L.; MARTEL, P. H.; McMASTER, M. E.; PAICE, M. G.; PARROTT, J. L.; van den HEUVEL, M. R.; van der KRAAK, G. J. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: Roles of individual compounds and mill operating conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 27-3, 682–697, 2008.

HOODA, R.; BHARDWAJ, N. K.; SINGH, P. Screening and identification of ligninolytic bacteria for the treatment of pulp and paper mill effluent. **Water Air Soil Pollution**, Vol. 226, 2015.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **2020 Relatório Anual**. Acessado em: 16/12/2020. Disponível em: < <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>>.

IPPC – Integrated Pollution Prevention and Control. **Best Available Techniques (BAT) reference I for the production of pulp, paper and board. Industrial emissions directive**. Joint Reserch Centre: Institute for Prospective Technological Studies, Sustainable Production and Consumption. Unit European Commission Bureau.Bruxelas. Final Draft July 2015.

JAMES, C. N.; COPELAND, R. C.; LYTHER, D. A. Relationships between oxidation-reduction potential, oxidant, and ph in drinking water. **American Water Works Association Conference**,

2004.

JARDIM, W. F. Medição e interpretação de valores do potencial redox (Eh) em matrizes ambientais. **Química Nova**. Vol. 37, 1233-1235, 2014.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamentos de esgotos domésticos**. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, 4. ed. Rio de Janeiro, 2016.

JUNIOR, E. S.; CARVALHO, L. A. Comportamento da celulose na pauta das exportações brasileiras. **XII FATECLOG - Gestão Da Cadeia De Suprimentos No Agronegócio: Desafios E Oportunidades No Contexto Atual**. 18 e 19 de junho, Mogi das Cruzes – SP 2021.

KAMALI, M.; KHODAPARAST, Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 114, 326–342, 2015.

KRSMANOVIC, M.; BISWAS, D.; ALI, H.; KUMAR, A.; GHOSH, R.; DICKERSON, A. K. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, article 102336, 2021.

KUMAR, V.; DHALL, P.; KUMAR, R.; SINGH, Y. P.; KUMAR, A. Bioremediation of agro-based pulp mill effluent by microbial consortium comprising autochthonous bacteria. **The Scientific World Journal**, Article ID 127014, 2012.

KUMAR, V.; SONKAR, M.; POOJA, Y.; SHUKLA, S. K. Chapter 11 **Recent Advancement on Bioaugmentation Strategies for Process Industry Wastewater (PIWW) Treatment**. In: BHATTACHARYA, S.; GUPTA, A. B.; GUPTA, A.; PANDEY, A. Water Remediation. Springer, 22 de dez. de 2017.

KUZMINA, L. Y.; GILVANOVA, E. A.; GALIMZYANOVA, N. F.; ARKHIPOVA, T. N.; RYABOVA, A. S.; AKTUGANOVA, G. E.; SIDOROVA, L. V.; KUDOYAROVA, G. R.; MELENT'EV A. I. Characterization of the novel plant growth-stimulating strain *Advenella kashmirensis* IB-K1 and evaluation of its efficiency in saline soil. **Microbiology**, Vol. 91, p. 173–183, 2022.

LABADIE, M.; RANDRIANJATOVO-GBALOU, I.; ZAIDI-AIT-SALEM; M.; LÉTISSE, V. D.; FONTAGNÉ-FAUCHER; C.; MARCATO-ROMAIN, C. E. A dynamic resazurin microassay allowing accurate quantification of cells and suitable for acid-forming bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. Vol. 183, April 2021.

LAKOWICZ, J. R. **Introduction to Fluorescence**. In: Lakowicz, J.R. (eds) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, Boston, 2006.

LARREA, L.; FORSTER, C. F.; MELÉ, D. Changes in lignin during diffused air activated sludge treatment of kraft effluents. **Water Research**. Vol. 9, p. 1073-1080, 1989.

LEWIS, R.; COHEN, J.; AWAD, J.; BURGER, H.; MARZOUK, J.; BURCH, G.; LEWIS, D. M.; VAN LEEUWEN, J. A. Study of the impacts of process changes of a pulp and paper mill on aerated stabilization basin (ASB) performance. **Chemosphere**. Vol. 211, p. 767-774, 2018.

LIANG, J.; MAI, W.; WANG, J.; LI, X.; SU, M.; DU, J.; WU, Y.; DAI, J.; TANG, Q.; GAO, J.; LIU, Y.; TANG, J.; WEI, Y. Performance and microbial communities of a novel integrated industrial-scale pulp and paper wastewater treatment plant. **Journal of Cleaner Production**,

Vol. 278, 2020.

MACHADO, E. P. **Tratabilidade de efluente kraft por processo biológico facultativo assistido com enzimas lignolíticas**. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 113p, 2017.

MACHADO, E. P.; XAVIER, C. R.; COUTO, G. H. Tratamento de efluente kraft em lagoa aerada facultativa empregando enzimas lignocelulolíticas. **Interciencia**. Vol. 43(8), 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14^o ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAJUMDAR, S.; PRIYADARSHINEE, R.; KUMAR, A.; MANDAL, T.; MANDAL, D. D. Exploring *Planococcus* sp. TRC1, a bacterial isolate, for carotenoid pigment production and detoxification of paper mill effluent in immobilized fluidized bed reactor. **Journal of Cleaner Production**, 2019.

MALAVIYA, P.; RATHORE, V. S. Bioremediation of pulp and paper mill effluent by a novel fungal consortium isolated from polluted soil. **Bioresource Technology**. Vol. 98, p. 3647–3651, 2007.

MANJULADEVI, M.; KALAISELVAN, S. Applications of UV-Visible and FT-IR spectral analysis in effluent treatment. **OMICS International, ebooks**. ISBN: 978-1-63278-014-0, 35p., 2020.

MARISCAL, A.; LOPEZ-GIGOSOS, R. M.; CARNERO-VARO, M.; FERNANDEZ-CREHUET, J. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 82, p. 773–783, 2009.

MARTINS, K. P. **Índice de avaliação do desempenho ambiental do processo produtivo de papel e celulose**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Administração, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal – SP, 91p., 2020.

MEHRING, A.; ERDMANN, N.; WALTHER, J.; STIEFELMAIER, J.; STRIETH, D.; ULBER, R. A simple and low-cost resazurin assay for vitality assessment across species. **Journal of Biotechnology**. Vol. 333, 63–66; 2021.

MELCHIORS, E. **Avaliação do desenvolvimento de biofilme em meio suporte esponjoso em reator biológico de leito móvel (MBBR) no tratamento de efluente de indústria de celulose** (Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 77p, 2019.

MILESTONE, C. B.; FULTHORPE, R. P.; STUTHRIDGE, T. R. The formation of colour during biological treatment of pulp and paper wastewater. **Water Science & Technology**. Vol. 50(3), p. 87 – 94, 2004.

NISSHINBO CHEMICAL INC. **Aquaporousgel**. Disponível em: <<https://www.nisshinbo-chem.co.jp/english/products/apgbcn/apg.html>>. Acesso em: 19 jan. 2021.

NUNES, J. V. **Avaliação do tratamento de efluentes kraft pelo processo de bioaumentação com bactérias isoladas de lagoa facultativa aerada para remoção de compostos específicos**

(Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

NUNES, J. V.; XAVIER, C. R.; BORDIN, E. R.; RAMSDOR, W. A. Adequação de nutrientes em lagoa aerada facultativa tratando efluente kraft. **Anais III SIMBAQBI, UTFPR, Câmpus Curitiba – PR**, 28 a 30 de setembro de 2020.

OGUGBUE, C. J.; SAWIDIS; T. Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by *Aeromonas hydrophila* isolated from industrial effluent. **Biotechnology Research International**, Article ID 967925, 2011.

OLIVEIRA, D. V. M.; OLIVEIRA FILHO, A. C.; RABELO, M. D.; NARIYOSHI, Y. N. Avaliação de uma planta piloto de MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor - reator biológico com leito móvel) para tratamento de efluente de uma fábrica de celulose e papel. **O Papel**, Vol. 73 (10), p. 75 – 80, 2012.

ORTEGA, F. S.; ROCHA, K. M.; ZAIAT, M.; PANDOLFELLI, V. C. Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via “gelcasting” em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. **Cerâmica**, Vol. 47, p. 199-203, 2001.

PALIWAL, R.; UNİYAL, S.; RAI, J. P. N. Evaluating the potential of immobilized bacterial consortium for black liquor biodegradation. **Environmental Science and Pollution Research**. Vol. 22, p. 6842–6853, 2015.

PARANÁ. Conselho Estadual do Meio Ambiente – **CEMA. Resolução nº 070/2009**. Dispõe sobre licenciamento ambiental, estabelece condições e critérios e dá outras providências, para Empreendimentos Industriais. Diário Oficial. Curitiba, 2009.

PAZDA, A. P. **Avaliação da dosagem de nutrientes em sistema de lagoa aerada facultativa tratando efluente kraft** (Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

PEITZ, C. **Desempenho de sistema modificado de lagoa aerada com meio de suporte em leito móvel no tratamento de efluente de celulose kraft**. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 83p, 2018.

PEITZ, C.; XAVIER, C. R. Evaluation of aerated lagoon modified with spongy support medium treating Kraft pulp mill effluent. **Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia**, Vol. 92, p. 70-79, 2019.

PEITZ, C.; XAVIER, C. R. Tratamento de efluente kraft contendo fitoesteróis por reator de leito móvel MBBR. **Interciencia**. Vol. 42(8), p. 536-541, 2017.

PING, L.; ZHUANG, H.; SHAN, S. New insights into pollutants removal, toxicity reduction and microbial profiles in a lab-scale IC-A/O-membrane reactor system for paper wastewater reclamation. **Science of the Total Environment**. Vol. 674, p. 374–382, 2019.

POKHREL, D.; VIRARAGHAVAN, T. Treatment of pulp and paper mill wastewater – A review. **The Science of the Total Environment**. Vol. 333, p. 37–58, 2004.

RAJ, A.; KUMAR, S.; HAQ, I.; SINGH, S. K. Bioremediation and toxicity reduction in pulp

and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic *Paenibacillus* sp. **Ecological Engineering**. Vol.71, p. 355–362, 2014.

RAJWAR, D.; PALIWAL, R.; RAI, J. P. N. Biodegradation of pulp and paper mill effluent by co-culturing ascomycetous fungi in repeated batch process. **Environmental Monitoring and Assessment**. Vol. 189, 2017.

RAM, C.; RANI, P.; GEBRU, K. A.; ABRHA, M. G. M. Pulp and paper industry wastewater treatment: use of microbes and their enzymes. **Physical Sciences Reviews**, Vol. 5, Article 127287, 2019.

RASTEGARFAR, N.; BEHROOZ, R.; BAHRAMIFAR, N. Electrocoagulation treatment of black liquor from soda-AQ pulping of wheat straw. **Environmental Monitoring and Assessment**, Vol. 187, p.45, 2015.

RAUT, A. A.; PHUGARE, S. S.; KALYANI, D. C.; BAJEKAL, S. S. Biotreatment of paper mill effluent using alkaliphilic *Rhizobium* sp. NCIM 5590 isolated from meteoric alkaline Lonar Lake, Buldhana District, Maharashtra, India. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**. Vol. 1(9), 2018.

SANDERS, E. R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. **Journal of Visualized Experiments**. Vol. 63, p. 1-18, 2012.

SCHERER, K.; SOERJAWINATA, W.; SCHAEFER, S.; KOCKLER, I.; ULBER, R.; LAKATOS, M.; BRÖCKEL, U.; KAMPEIS, P.; WAHL, M. Influence of wettability and surface design on the adhesion of terrestrial cyanobacteria to additive manufactured biocarriers. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. Vol. 45, p. 931–941, 2022.

SEIXAS, A. F.; QUENDERA, A. P.; SOUSA, J. P.; SILVA, A. F. Q.; ARRAIANO, C. M.; ANDRADE, J. M. bacterial response to oxidative stress and RNA oxidation. **Frontiers in Genetics**. Vol. 12, Article 821535, 2022.

SHMAREVA, M. N.; AGAFONOVA, N. V.; KAPARULLINA, E. N.; DORONINA, N. V.; TROTSSENKO, Y. A. Emended descriptions of *Advenella kashmirensis* subsp. *kashmirensis* subsp. nov., *Advenella kashmirensis* subsp. *methylica* subsp. nov., and *Methylopila turkiensis* sp. nov. **Microbiology**, Vol. 85(5), p. 646–648, 2016.

SILVA, M. W. B. S.; XAVIER, C. R.; FLÔR, I. C.; NUNES, J. V. Identificação da diversidade biológica em lodos ativados tratando efluentes de celulose. **XXV Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica – UTFPR**. Toledo, 2020.

SILVA, M. W. B.; XAVIER, C. R. COUTO, G. H. Avaliação da tratabilidade de efluente de celulose na remoção de compostos específicos por processo de bioaugmentação com bactérias autóctones. **XI seminário de extensão e inovação, XXVI seminário de iniciação científica e tecnológica**. 08 a 12 de novembro, Guarapuava, Paraná. SEI-SICITE, 2021.

SONKAR, M.; KUMAR, V.; KUMAR, P.; SHAH, M.P.; MAJUMDAR, C. B.; BISWAS, J. K.; DUTT, D.; MISHRA, P. K. Bioaugmentation with existing potent microorganisms to accelerate the treatment efficacy of paper industry wastewater pollutants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. Vol. 9, 105913, 2021.

SUBASHINI, A. M. Review on Biological Treatment processes of Pulp and Paper Industry Waste Water. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**. Vol. 4(5), p. 3721 – 3725, 2015.

SUBSANGUAN, T.; KHONDEE, N.; NAWAVIMARN, P.; RONGSAYAMANONT, W.; CHEN, C.; LUEPROMCHAI, E. Reuse of immobilized *Weissella cibaria* PN3 for long-term production of both extracellular and cell-bound glycolipid. **Biosurfactants. Biosurfactants From Immobilized LAB Cells**. Vol. 8, Article 751, 2020.

TRAVNICKOVA, E.; MIKULA, P.; OPRSA, J.; BOHACOVA, M.; KUBAC, L.; KIMMER, D.; SOUKUPOVA, J.; BITTNER, M. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. **AMB Express**. Vol. 9(1), 2019.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato Novo Hamburgo**, Vol. 14(22), p. 113-238, 2013.

TSAGKARI, E.; SLOAN, W. T. Turbulence accelerates the growth of drinking water biofilms. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. Vol. 41, p. 757–770, 2018.

USGS - National Field Manual for the Collection of water – **Quality Data (TWRI Book 9), Reduction-Oxidation Potential**, 2005. Disponível em: <http://water.usgs.gov/owq/FieldManual/Chapter6/6.5_contents.html>. Acesso em 02 de outubro de 2022.

VALDERRAMA, O.J.; ZEDDA, K.L.; VELIZAROV, S. Membrane filtration opportunities for the treatment of black liquor in the paper and pulp industry. **Water**. Vol. 13, p. 1-21, 2021.

VANZETTO, S. C.; KLENK, M.; ROSA, S. M. C.; XAVIER, C. R. Tratamento de efluente de indústria de papel e celulose por reator MBBR. **Hydro**. Vol. 89, p. 42- 45, 2014.

VASCONCELLOS, G. R. **Avaliação das condições de oxirredução em sistema alagado construído de escoamento horizontal subsuperficial** (dissertação de mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

VERDEL, N.; RIJAVEC, T.; RYBKIN, I.; ERZIN, A.; VELIŠČEK, Z.; PINTAR, A.; LAPANJE, A. Isolation, identification and selection of bacteria with the proof-of-concept for bioaugmentation of whitewater from woodfree paper mills. **Frontiers in Microbiology**. Vol. 12, Article 758702, 2021.

VILLAMAR, C. A.; JARPA, M.; DECAP, J.; VIDAL, G. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* as raw material. **Water Science & Technology—WST**. Vol. 59, 2009.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Vol. 1: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais. 4ª ed., 452 p, 2014.

VON SPERLING, Marcos. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias: Princípios básicos do tratamento de esgotos**. 2ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

WANG, W.; WU, Y.; ZHANG, C. High-density natural luffa sponge as anaerobic microorganisms carrier for degrading 1,1,1-TCA in groundwater. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. Vol. 40, p. 383–393, 2017.

WANG, X.; JIN, D.; ZHOU, L.; WU, L.; AN, W.; ZHAO, L. Draft genome sequence of *Advenella kashmirensis* Strain W13003, a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. **Genome Announcements**. Vol. 2(1), January/February 2014.

XAVIER, C. R.; OÑATE, E.; MONDACA, A. M.; CAMPOS, L. J., VIDAL, G. Genotoxic effects of kraft pulp mill effluents treated by biological aerobic systems. **Interciencia**, Vol. 36(6), p. 412 – 416, 2011.