

## II-239 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CLORO LIVRE EM BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES

**Diane Rodrigues Silveira<sup>(1)</sup>**

Engenheira Química pela Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Mestranda em Engenharia Química na Universidade do Sul de Santa Catarina (UFSC).

**Cleo Rodrigo Bressan<sup>(2)</sup>**

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Doutor em Engenharia Química pela UFSC.

**Hugo Moreira Soares<sup>(3)</sup>**

Engenheiro Químico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Mestre em Engenharia Química pela Universidade de São Paulo. Doutor em Engenharia Ambiental pela University of Massachusetts, EUA. Pós-doutor na Universidade de Aachen, Alemanha.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Douglas Seabra Levier, 140 – Trindade – Florianópolis - SC - CEP: 88040 - 410 - Brasil - Tel: (48) 99668614 - e-mail: [dianerodrigues@gmail.com](mailto:dianerodrigues@gmail.com)

### RESUMO

Atualmente na indústria são utilizados processos biológicos para remoção de nutrientes nos efluentes com alta carga de nitrogênio, sendo a nitrificação e desnitrificação os mais conhecidos. Por serem tecnologias que envolvem a atuação de bactérias, vários fatores podem interferir no processo, promovendo a diminuição da atividade biológica e resultando na diminuição da eficiência no tratamento das águas residuais. O cloro é comumente utilizado para limpeza de equipamentos e instalações, podendo entrar na corrente do efluente e promover toxicidade ou inibição nas bactérias utilizadas no tratamento biológico. O cloro livre em contato com micro-organismos difunde-se facilmente pela parede celular das bactérias inativando enzimas e comprometendo de forma parcial ou total o metabolismo celular. Desta forma, o presente trabalho busca avaliar o efeito do cloro livre sobre a cinética de consumo dos substratos das bactérias desnitrificantes para obtenção de dados referentes à toxicidade aguda do cloro sobre este grupo microbiano. Com este propósito, o inóculo de bactérias desnitrificantes foi aclimatado e enriquecido para utilização nos experimentos em batelada de toxicidade aguda. Foi utilizado nos testes de toxicidade hipoclorito de sódio nas concentrações de cloro livre de 0,00 a 100,00 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Inicialmente, a biomassa foi exposta ao cloro por 20 minutos e posteriormente centrifugada para a retirada do cloro, dando então início aos ensaios para avaliação das cinéticas de consumo dos substratos. Com este procedimento foi possível identificar a IC50 de 42,9 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, em concentrações celulares iniciais de 1,77 g SSV.L<sup>-1</sup> e pH de 7,3. Foi realizado também um experimento utilizando a IC50 obtida na desnitrificação variando a concentração de biomassa. Pôde-se observar que o cloro livre na concentração da IC50 obtida teve um efeito inibitório completo até a concentração de 1,0 g SSV.L<sup>-1</sup> e acima desta concentração a desnitrificação foi estabelecida através da biomassa que ainda permanecia ativa. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho apontam para um mecanismo de ação do cloro que resulta na inativação de uma quantidade fixa de biomassa para uma dada concentração de cloro livre, e não um percentual da mesma como é pressuposto no conceito de IC50.

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxicidade, cloro livre, bactérias desnitrificantes.

### INTRODUÇÃO

Algumas indústrias químicas no Brasil, como a fabricação de fertilizantes, apresentam em suas correntes de efluentes quantidades significativas de sulfato de amônio, havendo necessidade de sua remoção antes do seu destino final. Em alguns casos, estas correntes, além do íon amônio, possuem hipoclorito e pouca matéria orgânica disponível.

Existem alguns processos para remoção de nitrogênio em efluentes industriais. O processo convencional mais conhecido que vem sendo aplicado em escala industrial é a nitrificação e a desnitrificação heterotrófica (SCHMIDELL; REGINATTO, 2007). Na nitrificação, a amônia é oxidada a nitrito, seguida pela oxidação do

nitrito a nitrato, promovido pelas bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente. Na desnitrificação, várias bactérias heterotróficas participam do processo, sendo as do gênero *Pseudomonas* as mais frequentes, reduzindo nitrato a nitrogênio gasoso, na ausência de oxigênio (CERVANTES, 2009; SCHMIDELL; REGINATTO, 2007).

Além de sua importância como um processo de tratamento de efluentes, o ciclo biogeoquímico do nitrogênio tem importância fundamental na natureza, sendo um bom indicador dos impactos causados pelo lançamento de poluentes em ambientes naturais.

Por ser um processo que envolve a atuação de bactérias, vários fatores podem interferir no processo, promovendo a diminuição da atividade biológica e resultando na diminuição da eficiência no tratamento das águas residuais, como por exemplo a presença de cloro.

O hipoclorito de sódio (NaClO) em contato com a água produz cloro livre, na forma de ácido hipocloroso (HOCl) e íon hipoclorito (OCl<sup>-</sup>). Segundo BITTON (2005), o cloro livre causa vários danos na célula como perturbação na permeabilidade celular, danos aos ácidos nucleicos e enzimas, interrupção no transporte de nutrientes, inibição na respiração celular, entre outros. De acordo com GERARDI (2006), para os compostos exercerem atividade citotóxica, eles devem entrar nas células bacterianas sob uma forma solúvel. Além disso, segundo o mesmo autor, a forma ionizada ou não-ionizada do composto também afeta na sua toxicidade.

Trabalhos relacionados à toxicidade do cloro sobre a microbiota envolvida no tratamento de efluentes ainda são bastante escassos, visto que o cloro reage com vários compostos, como por exemplo, nitrito, compostos orgânicos, amônia (AZEVEDO NETTO, 1976; GERARDI, 2006; MEYER, 1994), sendo degradado antes de entrar nos processos biológicos, não havendo maiores efeitos sobre os mesmos. Porém, quando é utilizado cloro para limpeza de equipamentos e instalações ou mesmo como agente oxidante para remoção de compostos poluentes, podem ocorrer picos elevados na corrente do efluente e promover toxicidade ou inibição das bactérias utilizadas no tratamento biológico. O efeito crônico da aplicação de cloro nestas instalações é difícil de ser avaliado e não se tem maiores informações sobre o assunto.

Neste sentido, é importante avaliar a toxicidade aguda do cloro livre sobre as bactérias nitrificantes e desnitrificantes dando subsídios sobre o impacto deste agente oxidante em sistemas de tratamento biológico de efluentes industriais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

O inóculo de bactérias desnitrificantes foi obtido do tanque de contato de um sistema de lodos ativados da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento – CASAN de Florianópolis, utilizado no tratamento de esgoto sanitário. O mesmo foi aclimatado em laboratório utilizando um meio de cultura modificado a partir de CAMPOS et al. (1999), conforme descrito na Tabela 1 e acrescidos de NaNO<sub>3</sub> a 3035,714 mg.L<sup>-1</sup> e CH<sub>2</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O a 3980,34 mg.L<sup>-1</sup>, resultando em 500 mg de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.L<sup>-1</sup> e relação DQO/N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> igual a 3,7.

**Tabela 1 - Concentrações dos sais utilizados como meio de cultura e lavagem da biomassa. Adaptado de CAMPOS et al. (1999)**

Compostos	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	433,77
NaCl	1000,00
Solução de micronutrientes (*) (mL.L <sup>-1</sup> )	0,50

(\*) Preparada conforme Tabela 2.

**Tabela 2 - Solução de micronutrientes (VISHNIAC; SANTER, 1957)**

Compostos	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
EDTA.2H <sub>2</sub> O	55,35
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,10
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5,06
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	21,99
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,34
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,61
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,99

Após aclimatação e enriquecimento, a biomassa desnitrificante passou pelo procedimento de lavagem para remoção de substratos residuais antes dos experimentos de toxicidade. A biomassa foi lavada com o meio de cultura descrito na Tabela 1, nos quais os compostos foram dissolvidos em tampão fosfato. O tampão fosfato foi utilizado para manter o pH dos experimentos próximo de 7,4. A solução tampão foi preparada a partir de fosfato de potássio e hidróxido de sódio para pH 7,4 conforme descrito por MORITA; ASSUMPÇÃO (1972).

#### **Experimento para determinar o tempo de contato da biomassa com o cloro**

O experimento consistiu em colocar hipoclorito de sódio em contato com bactérias desnitrificantes para avaliar o tempo necessário de contato para que o cloro realize seus efeitos nas células antes de iniciar a cinética de consumo dos substratos, nitrato e acetato.

Foram utilizados 7 frascos de vidro de 50 mL, aos quais foram adicionados 30 mL de biomassa lavada em cada um, com concentração celular de 1,84 g SST.L<sup>-1</sup>. Em seguida foi adicionado 0,6 mL de uma solução de hipoclorito de sódio, resultando na concentração dentro dos frascos de 163,88 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.

Os frascos de sacrifício foram mantidos à temperatura de 30°C e agitação de 153 RPM em um Shaker Orbital Tecnal, modelo TE420. Os mesmos foram mantidos em anaerobiose com a adição de gás argônio e lacrados após a adição de hipoclorito.

A cada 15 minutos um frasco foi retirado para a determinação de SST, medição de pH e temperatura. Com esses dados pôde-se avaliar o tempo necessário em que o cloro exerça suas funções na célula. Possibilitou também a determinação do tempo de contato para ser utilizado nos experimentos de toxicidade aguda nos processos de desnitrificação e nitrificação.

#### **Experimento variando a concentração de cloro livre**

Na primeira etapa deste experimento foi promovido o contato da biomassa desnitrificante com o hipoclorito de sódio. Foram utilizados 9 frascos de vidro e adicionado 250 mL de biomassa lavada a 1,77 g SSV.L<sup>-1</sup> em cada frasco (0,44 g SSV em massa).

Em seguida tomou-se diferentes alíquotas de hipoclorito de sódio P.A. e diluído em água para posterior adição de 5 mL de solução nos frascos. Os cálculos foram planejados para que dentro dos frascos contivessem concentrações conhecidas de cloro, conforme estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3 - Concentrações de hipoclorito de sódio adicionadas no teste de toxicidade.**

Frascos	Concentração de cloro livre dentro dos frascos (mg Cl <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )
1	0,00
2	1,00 (10 <sup>0</sup> )
3	3,16 (10 <sup>0,5</sup> )
4	5,62 (10 <sup>0,75</sup> )
5	10,00 (10 <sup>1</sup> )
6	17,78 (10 <sup>1,25</sup> )
7	31,62 (10 <sup>1,5</sup> )
8	56,23 (10 <sup>1,75</sup> )
9	100,00 (10 <sup>2</sup> )

As concentrações de cloro foram baseadas na variação de 0 a 2 na potência 10 para a identificação da faixa logarítmica de inibição do cloro e determinação do IC50 (concentração necessária para inibir em 50% a atividade microbiana) após a cinética, na segunda etapa.

O contato entre a biomassa e o cloro foi realizado com o tempo obtido do experimento anterior (20 minutos). Após o tempo de contato, a solução foi centrifugada a 3.400 RPM em centrífuga de marca Quimis, modelo QA222TM-O4 de raio 15,5 cm. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e a biomassa contida no fundo dos tubos Falcon foi submetida à solução de lavagem Tabela 1 (dissolvidos em tampão fosfato) e centrifugado novamente, para não haver presença de cloro na próxima etapa.

Na segunda etapa, a biomassa remanescente em cada frasco foi avolumada a 500 mL com solução de sais (Tabela 1), dissolvidos em tampão fosfato e acrescidos de NaNO<sub>3</sub> e CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O de modo a obter uma concentração final de 500 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. L<sup>-1</sup> e 1726 mg CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>.L<sup>-1</sup>, resultando em uma relação mássica DQO/N de 3,744.

Os frascos foram incubados à temperatura constante de 35°C e agitados a 126 RPM em um Shaker Orbital Tecnal, modelo TE420. Os mesmos foram mantidos em anaerobiose com adição de gás argônio e lacrados com tampa de borracha. Foi utilizado um sistema de mangueiras para a retirada das amostras.

A cada 45 minutos foram coletadas amostras de 15 mL e centrifugadas por 10 minutos a 3.400 RPM (2000 x g) em centrífuga de marca Quimis, modelo QA222TM-O4. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado utilizando filtros para seringas com diâmetro dos poros de 0,2 µm e em seguida foi medido o pH. As amostras foram então armazenadas para posterior análise dos compostos nitrogenados na forma de nitrato e nitrito, e acetato. O tempo final do experimento foi de 5,25 horas, totalizando em 8 pontos de amostragem para cada concentração de cloro adicionado.

Apenas na coleta das amostras do tempo zero de experimento foi realizado análise de SST e SSV, visto que anteriormente cada frasco foi mantido em contato com concentrações crescentes de hipoclorito. Desta forma a cinética foi realizada em várias concentrações diferentes de biomassa remanescente.

#### **Experimento variando a concentração celular sobre a toxicidade do cloro**

Na primeira etapa foram utilizados 7 frascos de vidro com 250 mL de biomassa com concentração celular de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, e 6,0 g SST.L<sup>-1</sup> e promovido o contato com hipoclorito de sódio à concentração final nos frascos de 42,60 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (valor da IC50 encontrada no experimento anterior).

A partir de então o experimento foi conduzido do mesmo modo que o experimento variando a concentração celular.

## DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

- Íons nitrato, nitrito e acetato

As análises dos íons nitrato, nitrito e acetato foram realizadas em um cromatógrafo de íons marca DIONEX (Sunnyvale, Estados Unidos), modelo ICS 5000 EG, composto de um sistema capilar equipado com detector condutivimétrico, gerador de eluente KOH e supressora eletrolítica.

As concentrações dos compostos foram determinadas a partir de uma curva padrão de cada íon.

- Cloro livre

O cloro foi quantificado utilizando a metodologia DPD, através do kit composto por dois reagentes, iodeto de potássio e solução de DPD (N,N-dietil-p-fenilenediamina), adquirido pela empresa Alfakit. Este kit determina a quantidade de cloro livre na água, com a metodologia adaptada do Standard Methods, método 3500 B, 3-58 (APHA; AWWA; WEF, 2005).

Neste método, o cloro livre reage com o reagente DPD desenvolvendo uma coloração rósea sendo quantificada no comprimento de onda de 515 nm. Foi utilizado para a leitura um espectrofotômetro marca HACH e modelo DR5000.

A partir da absorbância, obtém-se a concentração em  $\text{mg Cl}_2\text{.L}^{-1}$ . A concentração de cloro livre é determinada através de uma curva padrão. Esta curva é preparada a partir de amostras diluídas de permanganato de potássio.

- Sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV)

Os sólidos suspensos totais (SST) foram determinados de acordo com a metodologia descrita por ZDRADEK; SCHMIDELL; SOARES (2006), utilizando membranas de acetato celulose e micro-ondas para secagem. A concentração de SST é obtida a partir da diferença entre as massas secas das membranas antes e depois da filtragem da amostra.

Os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foram determinados de acordo com o método descrito pelo *Standard Methods* (APHA et al., 2005). Foi realizado com as membranas previamente submetidas à análise de SST. Neste método a biomassa é calcinada a  $600^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Os resultados foram obtidos em  $\text{g SSV}\text{.L}^{-1}$ .

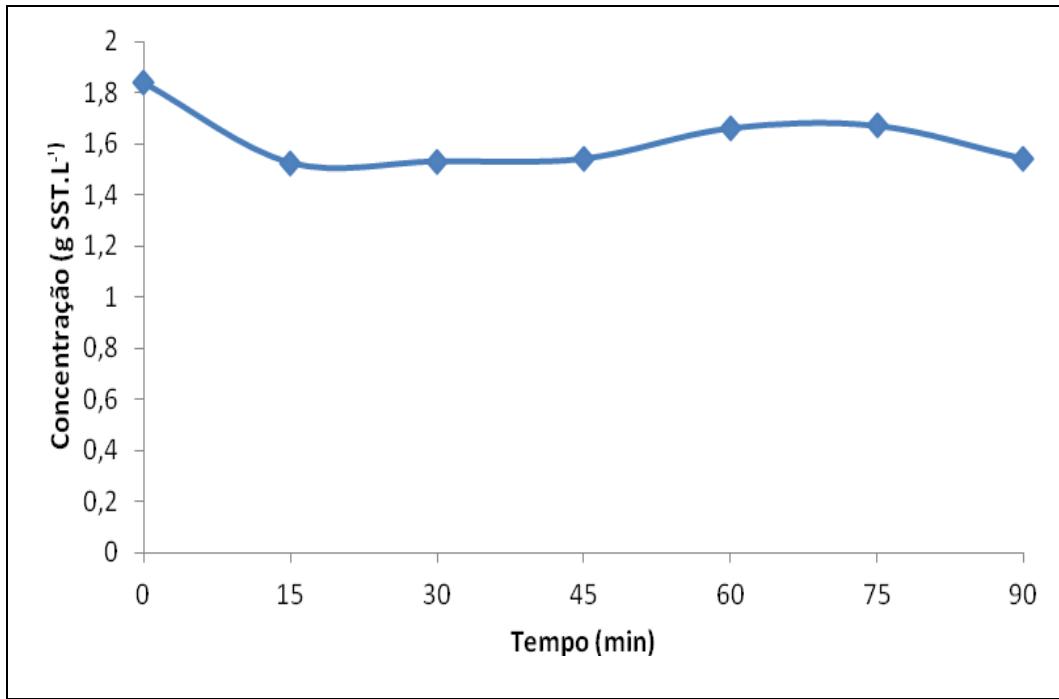
## RESULTADOS

### Determinação do tempo de contato com o cloro

Segundo AZEVEDO NETTO (1976), a ação desinfetante do cloro é uma ação de superfície, portanto há uma necessidade de se favorecer o encontro o desinfetante e o agente que se pretende destruir. Desta forma, o experimento realizado possibilitou este encontro da biomassa com o cloro para determinar o tempo de contato.

A Figura 1 mostra a média do comportamento dos SST ao longo do tempo em que ficou em contato com o hipoclorito, com concentração dentro dos frascos de  $163,88 \text{ mg Cl}_2\text{.L}^{-1}$ . Entretanto, houve um decaimento na concentração celular no tempo 0 ao 15 minutos de contato, permanecendo então praticamente constante até o final do experimento.

Foram utilizados apenas os dados de SST devido a variabilidade grande nos resultados de SSV. Além de que, as bactérias foram cultivadas em meio sintético, no qual é possível considerar que a relação SST/SSV é pouco variável, podendo considerar que a variação de SST representa proporcionalmente a variação da concentração de biomassa (ZDRADEK et al., 2006).



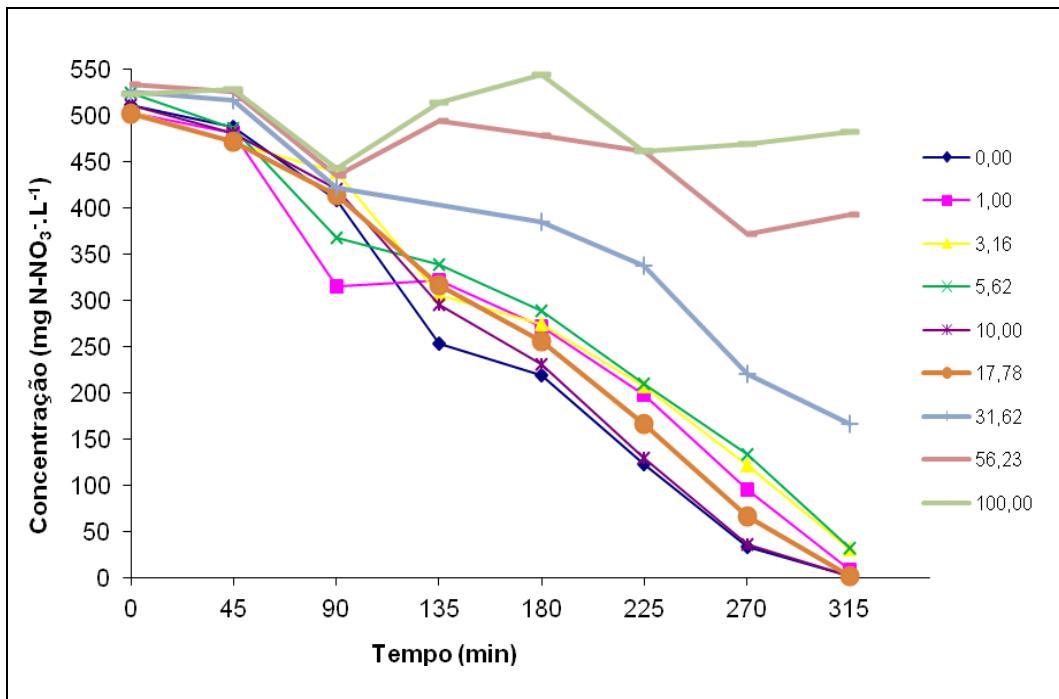
**Figura 1 - Acompanhamento dos SST ao longo do tempo com a adição de hipoclorito de sódio à concentração final de  $163,88 \text{ mg Cl}_2\text{L}^{-1}$ .**

O efeito tampão possibilitou a permanência do pH durante todo o experimento em 7,6, visto que a adição do cloro na água provoca variação de pH no meio. Já a temperatura permaneceu na faixa de 26,7 a 28,6°C.

Com os resultados apresentados, foi adotado como padrão nos experimentos de toxicidade o tempo de 20 minutos para o contato do cloro com a biomassa com o cloro a ser utilizados.

#### **Experimento variando a concentração de cloro livre**

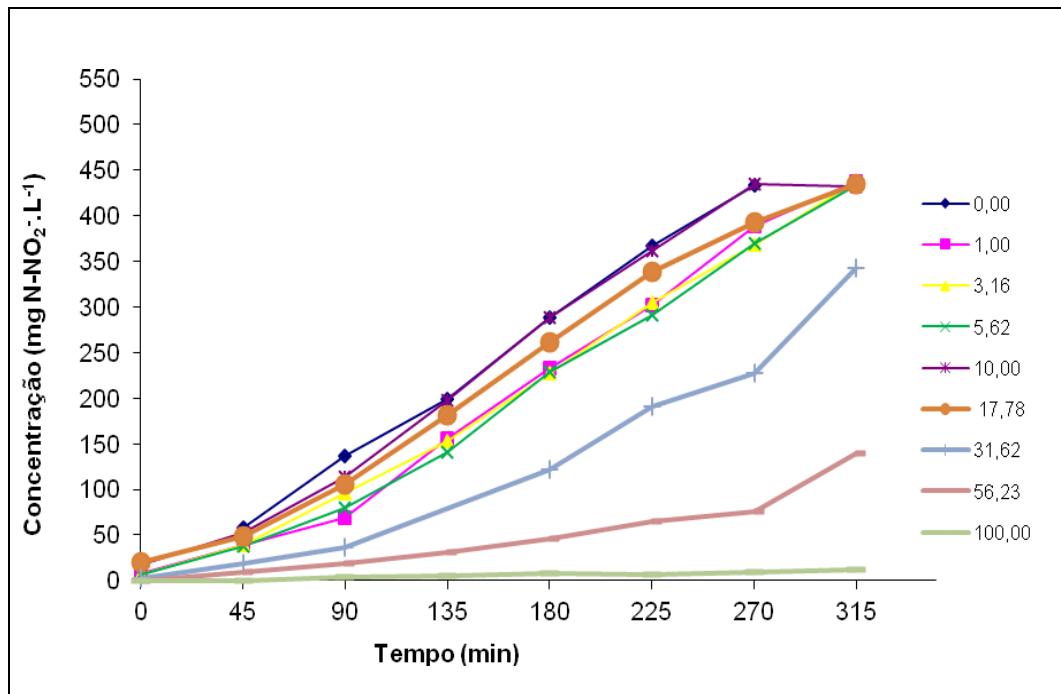
O ensaio cinético para estudo da toxicidade aguda do cloro sobre a desnitrificação foi conduzido por um período de 315 min. A Figura 2 apresenta os dados de consumo de nitrato durante o ensaio, sendo que cada linha representa um frasco, no qual foram adicionadas concentrações diferentes de cloro na etapa de contato com a biomassa.



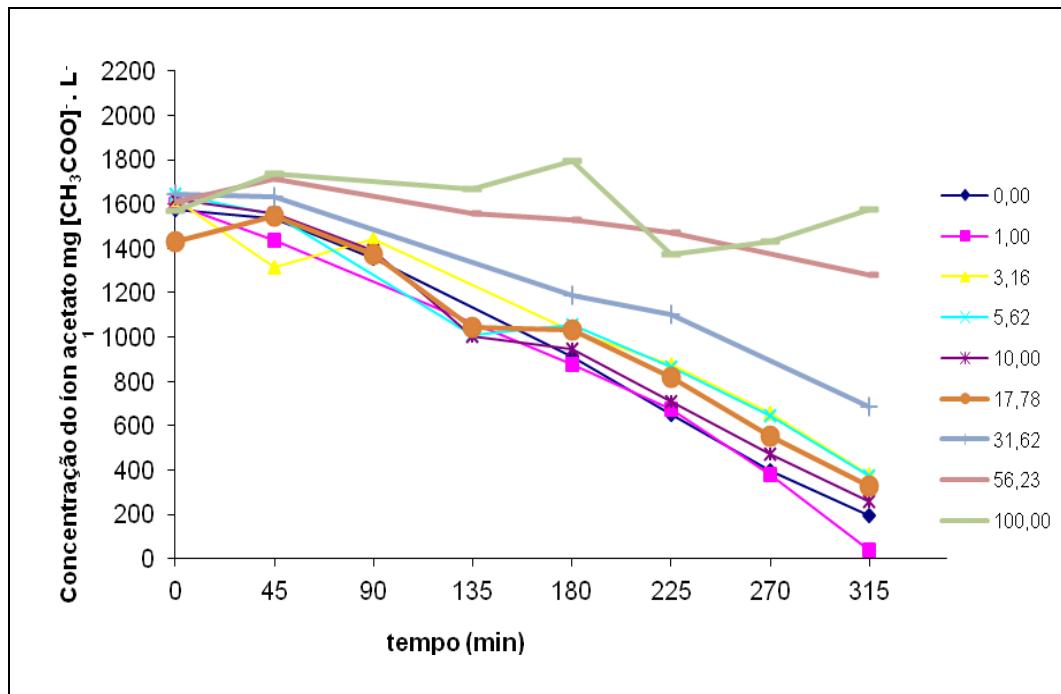
**Figura 2 - Experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias desnitrificantes. Consumo de nitrato em função da concentração de cloro livre ( $\text{mg Cl}_2\text{L}^{-1}$ ) adicionada anteriormente sobre as bactérias desnitrificantes.**

Pôde-se observar na Figura 2 que a partir da concentração de 31,63  $\text{mg Cl}_2\text{L}^{-1}$  o consumo de nitrato apresenta uma evidente redução na velocidade. Isto pode significar visualmente um comportamento inibitório, comparando com o frasco onde não foi adicionado cloro. O mesmo pode ser observado na Figura 3, na qual é apresentada a formação de nitrito (A) e o consumo de acetato (B) durante o ensaio de desnitrificação.

A



B



**Figura 3 – Cinética de desnitrificação em função da concentração de cloro livre (mg Cl<sub>2</sub> · L<sup>-1</sup>) em experimento de toxicidade aguda. (A) Formação de nitrito. (B) Consumo de acetato.**

Os experimentos foram acompanhados no tempo de 5,25 horas para se observar a primeira etapa de transformação (reação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> à NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), isto é, a intenção não foi avaliar a conversão até nitrogênio gasoso porque isso dificultaria a avaliação da inibição.

Com os dados de coeficiente angular de cada reta formada, juntamente com os dados de concentração de biomassa remanescente em cada frasco, foram obtidos valores de velocidades consumo de nitrato para cada

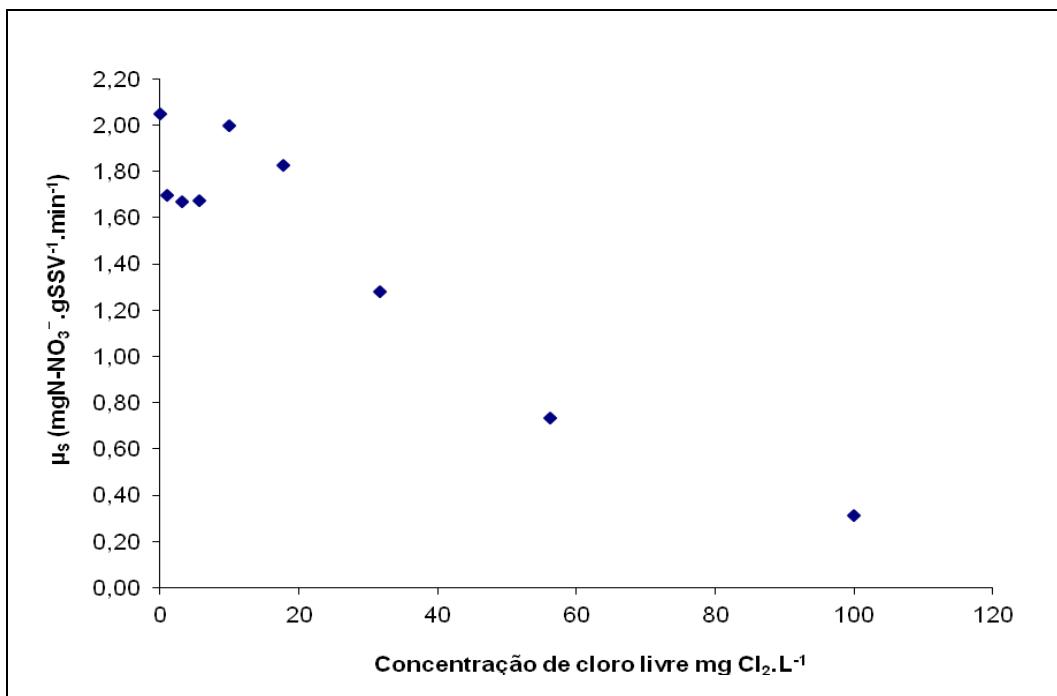
concentração de cloro livre adicionado (Tabela 3). Os valores de inibição em porcentagem também foram obtidos a partir destas velocidades.

**Tabela 4 - Velocidades de redução de nitrato e respectivas velocidades específicas nas diferentes concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias desnitritificantes.**

Concentração de cloro livre (mg Cl <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	-r <sub>s</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	-μ <sub>s</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .gSSV <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	Inibição (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (%)
0,00	2,01	2,05	0,00
1,00	1,68	1,69	17,21
3,16	1,57	1,67	18,45
5,62	1,45	1,67	18,37
10,00	1,96	2,00	2,53
17,78	1,80	1,83	10,70
31,62	1,18	1,28	37,51
56,23	0,68	0,74	64,07
100,00	0,31	0,31	84,69

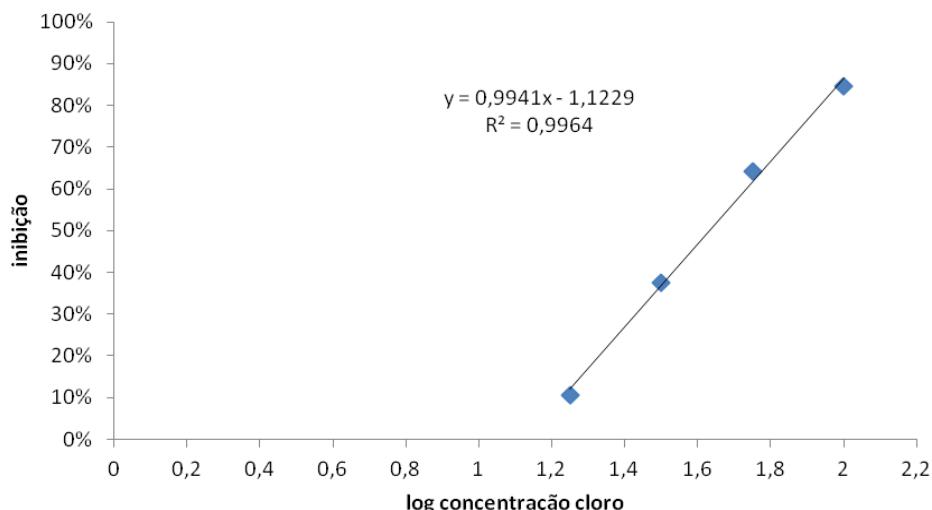
Os valores de velocidade específica obtidos ao longo do experimento apresentaram uma variação decrescente. Duas possibilidades pra explicar esse comportamento: alteração na atividade das bactérias que permaneceram vivas e/ou modificação na fração de células vivas e mortas.

Pode-se observar (Figura 4) que as velocidades específicas nos frascos em que continham cloro livre de 1,00, 3,16 e 5,62 mg Cl<sub>2</sub><sup>-1</sup> tiveram um comportamento discrepante dos demais dados na curva formada. Com a matriz de ensaios realizada, não é possível explicar a inconsistência dos resultados obtidos nessa faixa de concentração. Porém, para os cálculos de IC50 não foi necessário utilizar estes dados discrepantes já que a obtenção destes valores se dá na faixa de inibição, que neste caso inicia claramente a partir das 10 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.



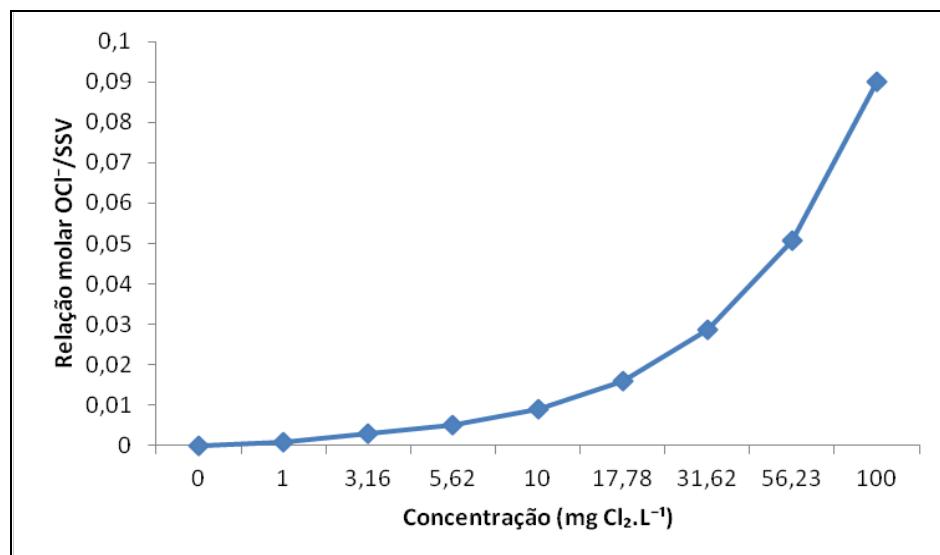
**Figura 4 - Velocidades específicas de redução do nitrato em função das concentrações de cloro livre adicionadas sobre as bactérias desnitritificantes.**

Foi possível determinar a IC<sub>50</sub> a partir da correlação entre o grau de inibição na desnitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre (Figura 5). A faixa de inibição do cloro entre 17,8 e 100 mg.L<sup>-1</sup> foi utilizada para traçar o gráfico, onde se obteve a equação  $y = 0,9941x - 1,1229$  ( $R^2=0,9964$ ). O valor encontrado da IC<sub>50</sub> foi de 42,91 mg Cl<sub>2</sub> .L<sup>-1</sup>



**Figura 5 - Correlação entre o grau de inibição na desnitrificação e o logaritmo da concentração de cloro livre.**

Outro caso que pode ser discutido neste ensaio de toxicidade é a relação de cloro e a quantidade de biomassa adicionada. Na oxidação completa da matéria orgânica pelo cloro o carbono da biomassa oxida doando 4 elétrons (equação 1) e o cloro se reduz recebendo 2 elétrons (equação 2). Portanto, considerando que 1 mol de biomassa apresenta 5 carbonos, são necessários 10 moles de cloro para oxidação completa de 1 mol de biomassa (OCl<sup>-</sup>/SSV molar igual a 10:1). Na Figura 6, podem ser observadas as relações molares de cloro e biomassa em que foi inserido em cada frasco nos ensaios de toxicidade.



**Figura 6 – Relação molar de cloro livre adicionado em bactérias desnitrificantes e sólidos suspensos voláteis inicial, na etapa de contato.**

Pode-se observar que mesmo para uma relação molar  $\text{OCl}^-/\text{SSV}$  de 0,09 (frasco contendo 100 mg  $\text{Cl}_2\text{L}^{-1}$ ), bem abaixo da relação molar necessária para oxidação completa da biomassa (10:1), já se observou uma inibição quase total da atividade microbiana. Isto se explica facilmente se considerar que apenas uma oxidação parcial já é suficiente para que uma biomolécula perca a sua funcionalidade, portanto, a destruição/inativação de uma pequena parcela das macromoléculas já é suficiente para inativar completamente a célula.

Outro ponto de vista observado foi o efeito do cloro sobre a composição da biomassa. Após o contato do cloro com a biomassa desnitrificante, as relações mássicas entre os SSV e SST em todos os frascos permaneceram constantes em 0,72, isto é, não houve alteração nesta relação ao adicionar concentração maior de cloro livre. Isso pode evidenciar que a biomassa inativa oxidada pelo cloro pode também estar sendo quantificada na determinação dos sólidos voláteis após a exposição ao cloro, de modo que não é possível afirmar se os valores mais reduzidos de atividade específica onde se observou inibição representam uma queda na atividade das células remanescentes ou apenas uma subestimação dos valores devido à presença de uma parcela de células inativadas nos sólidos suspensos.

#### Avaliação da influência da concentração celular sobre a toxicidade do cloro

As quantidades adicionadas de cloro livre nos experimentos anteriores não foram suficientes para oxidar completamente a biomassa, mas observar o efeito causado em uma concentração celular fixa. Entretanto, o objetivo deste item era observar o efeito do comportamento da IC50 em diversas concentrações celulares.

Os resultados de consumo de nitrato obtidos no ensaio realizado para verificação da influência da concentração celular sobre a magnitude dos efeitos inibitórios do cloro estão apresentados na Figura 7. O ensaio teve duração total de 6 h e 15 min onde foram testadas diferentes concentrações celulares na etapa de contato com o cloro, sempre na presença de 42,6 mg  $\text{Cl}_2\text{L}^{-1}$  (IC50 obtida no experimento anterior). Os pontos representam os valores médios das análises feitas em duplicita.

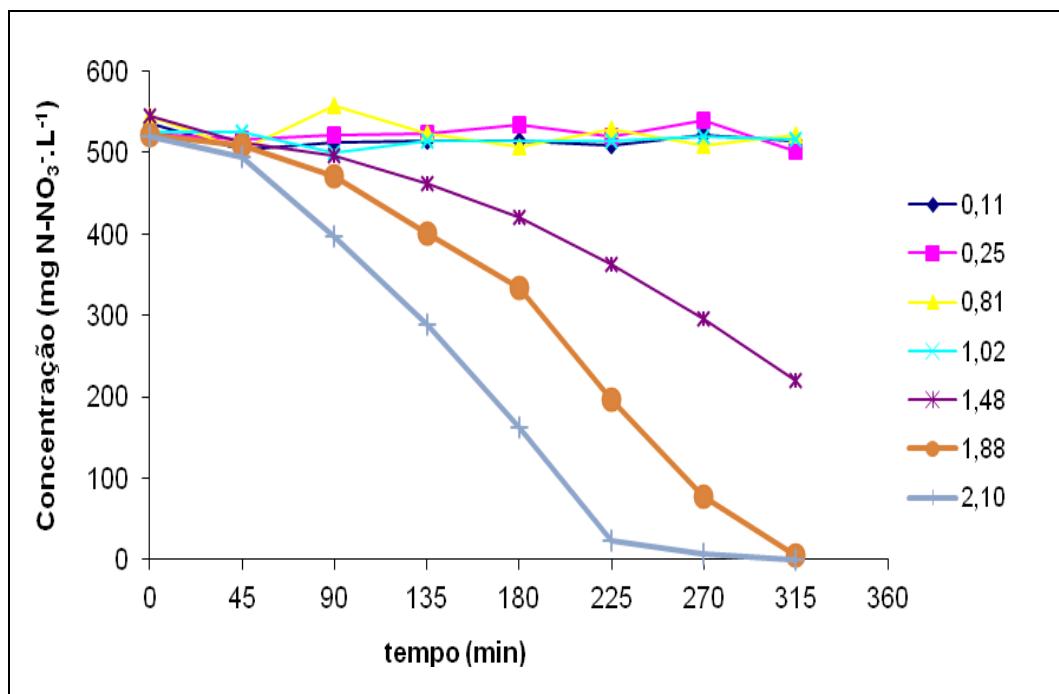
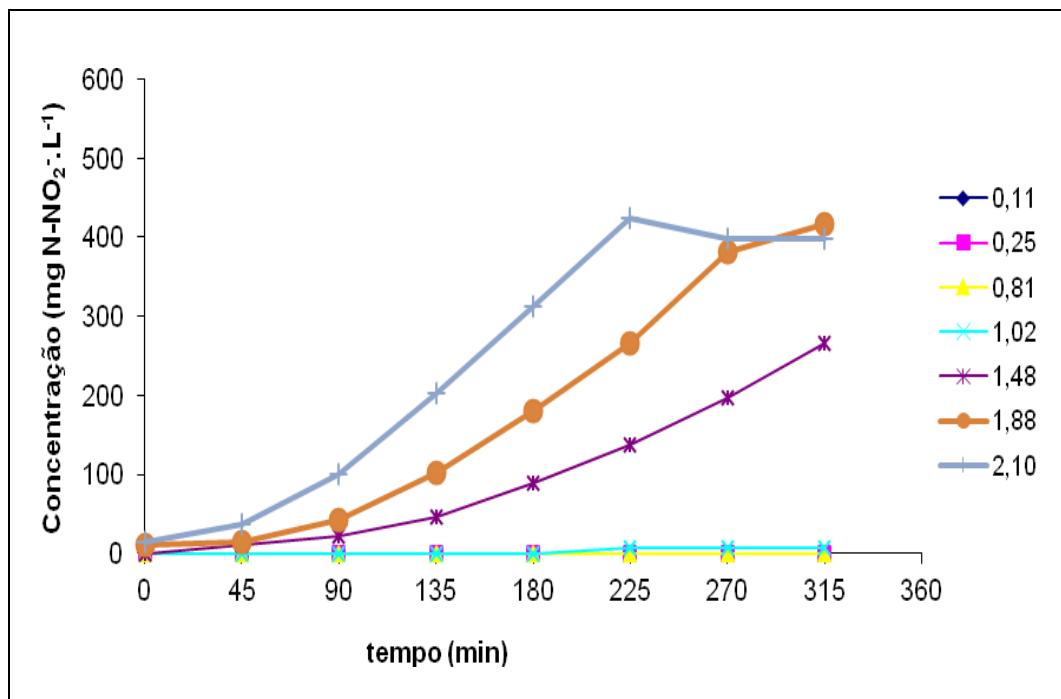


Figura 7 - Experimento de toxicidade aguda realizado com variação da concentração de bactérias desnitrificantes. Consumo de nitrato ao longo do tempo em função da concentração de SSV ( $\text{mg SSV.L}^{-1}$ ) após a etapa de contato com a biomassa e o cloro.

Pode-se observar que apenas nos frascos contendo 1,02, 1,88 e 2,10 g SSV.L<sup>-1</sup> houve consumo de nitrato, enquanto que nos demais frascos a inibição foi total e não houve degradação do substrato. Estes resultados são corroborados pelos perfis de formação de nitrito (A) e consumo de acetato (B) durante a cinética de desnitrificação (Figura 8 - A e B, respectivamente).

A



B

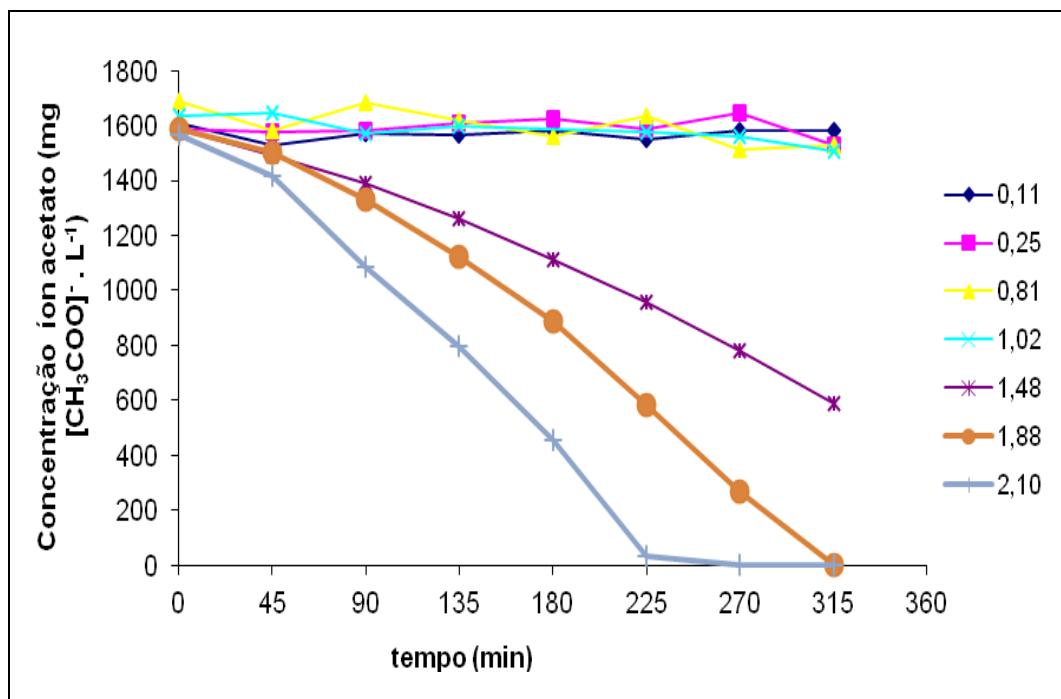


Figura 8 - Cinética de desnitrificação em função da concentração de SSV (mg SSV.L<sup>-1</sup>) em experimento de toxicidade aguda realizado com bactérias desnitrificantes. (A) Formação de nitrito. (B) Consumo de acetato.

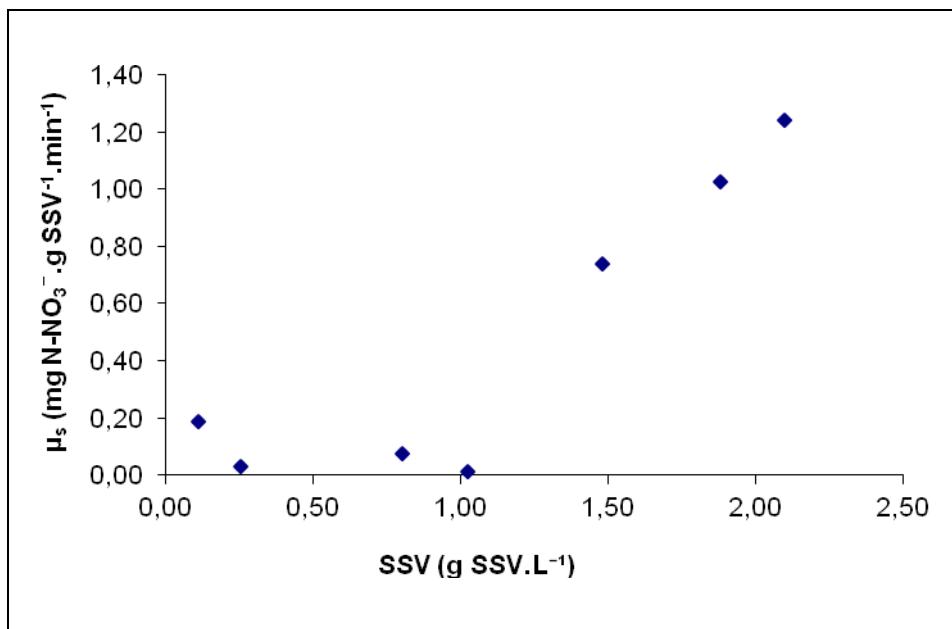
Com os dados de velocidade de consumo de nitrato, juntamente com os dados de concentração de biomassa remanescente em cada frasco, foram obtidos valores de velocidade específica de consumo de nitrato para cada concentração de biomassa testada (Tabela 4).

A concentração de SSV foi determinada no início do experimento no momento em que foram inseridos os substratos e iniciado o ensaio cinético de conversão sobre a biomassa desnitrificante.

**Tabela 5 - Velocidades de consumo de nitrato e respectivas velocidades específicas de consumo de nitrato nas diferentes concentrações de SSV, após o contato com cloro livre a 42,60 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.**

Concentração SSV (g SSV.L <sup>-1</sup> )	-r <sub>s</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	-μ <sub>s</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .g SSV <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
0,11 (±0,06)	0,02	0,19
0,25 (±0,04)	0,01	0,03
0,81 (±0,02)	0,06	0,08
1,02 (±0,04)	0,01	0,01
1,48 (±0,08)	1,09	0,74
1,88 (±0,11)	1,93	1,03
2,10 (±0,04)	2,61	1,24

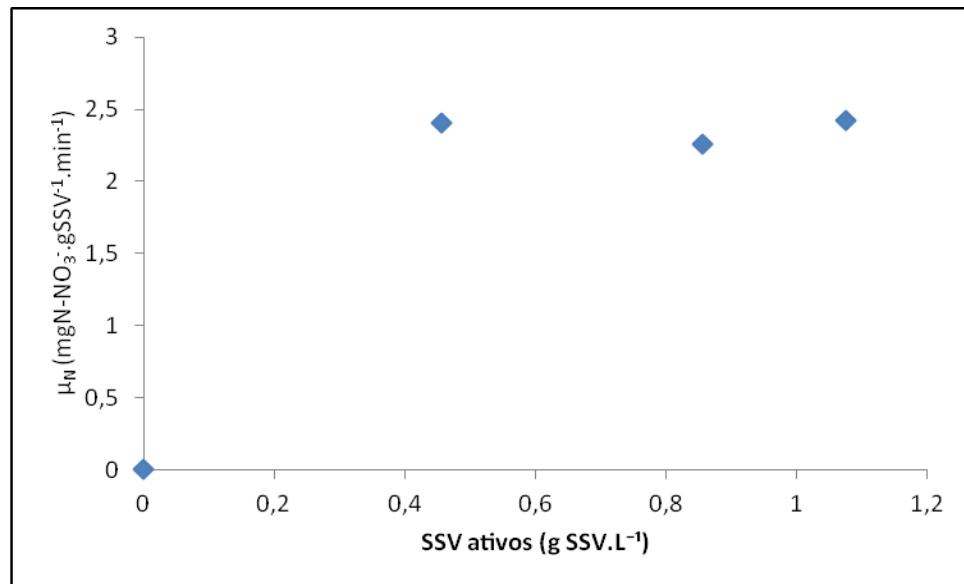
As velocidades específicas foram determinadas com os pontos em que o consumo de nitrato era linear. O comportamento das velocidades específicas em relação às concentrações de SSV se encontram na Figura 9, onde pode-se observar que nos fracos com até 1,02 g SSV.L<sup>-1</sup> houve inibição completa. Nos demais frascos, as velocidades específicas apresentaram um comportamento linear crescente.



**Figura 9 - Velocidades específicas de redução do nitrato versus concentração de biomassa desnitrificante, após o contato com cloro livre à concentração final nos frascos de 42,60 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> em ensaio de toxicidade aguda.**

Entretanto, a biomassa determinada pelas análises de SSV poderia estar ativa ou não, conforme já discutido anteriormente. Considerando a hipótese de que o cloro provavelmente não destruiu as células inativadas, isto é, não converteu tudo a dióxido de carbono, optou-se em desconsiderar a biomassa em que estava desativada para o cálculo das velocidades específicas.

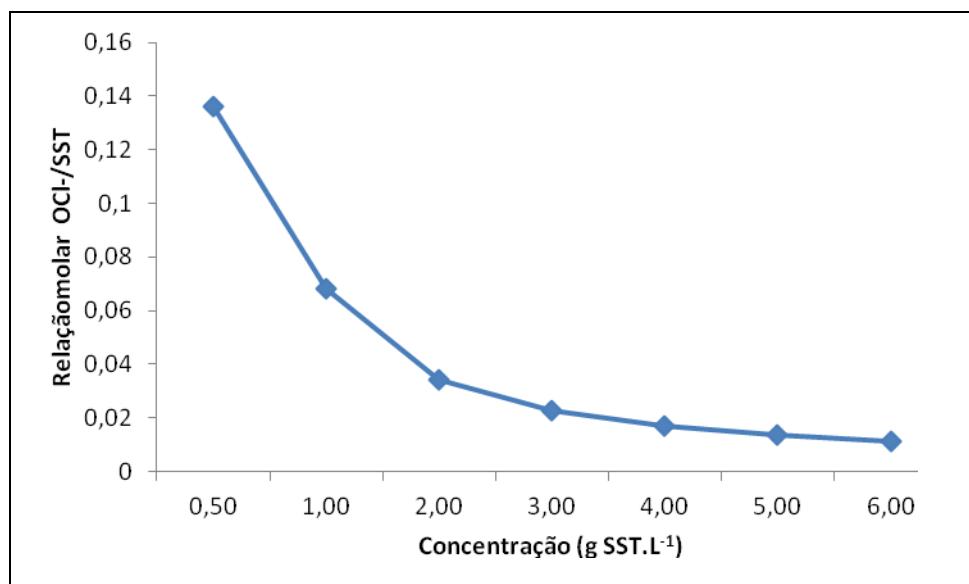
Como os frascos com até  $1,02 \text{ g SSV.L}^{-1}$  não obtiveram conversões, foi descontado esta massa do valor dos sólidos mensurados nos frascos em que tinha concentração maior de células. Assim, foram recalculadas as velocidades específicas com estes novos valores de biomassa (Figura 10).



**Figura 10 - Velocidades específicas de redução do nitrato versus variação da concentração de SSV ativos.**

Após este procedimento, pôde-se observar que as velocidades específicas permaneceram constantes para as concentrações que não apresentaram inibição completa, o que aponta para a possibilidade de que o cloro inative uma quantidade de biomassa fixa, e não um percentual como é pressuposto no conceito de IC50, demonstrando que este conceito não é adequado para o cloro.

Pode ser visto na Figura 11 relações molares menores que a estequiométrica (<10:1).



**Figura 11 – Relação molar de cloro livre e SST. Concentração fixa de cloro livre de  $42,60 \text{ mg.L}^{-1}$  dentro dos frascos e concentração de sólidos antes do contato com o cloro, com volume total nos frascos de 250mL.**

Pôde-se verificar que nos frascos contendo a menor concentração de biomassa ( $0,5 \text{ g SST.L}^{-1}$ ) a relação molar  $\text{OCl}^-/\text{SST}$  (0,14:1) foi abaixo da relação molar necessária para oxidação completa da biomassa (10:1). Entretanto, não houve consumo de substrato. Já nos frascos em que continham uma relação molar  $\text{OCl}^-/\text{SST}$  abaixo de 0,017, foi observado um consumo de substrato. Isto mostra que havia concentração celular suficiente para sofrer os efeitos do cloro e foi possível ainda estabelecer o processo de desnitrificação.

## CONCLUSÕES

Neste estudo pôde-se avaliar o efeito do cloro, após o contato com a biomassa, na desnitrificação através de testes de toxicidade aguda.

Conclui-se que é possível estabelecer a desnitrificação após o contato do cloro livre sobre as bactérias. Entretanto, isto depende de uma relação entre a concentração celular e a concentração de cloro livre presente. Apesar de não ter sido avaliada, a toxicidade é também afetada por variações de pH, uma vez que o mesmo afeta o equilíbrio químico da dissociação do cloro modificando a sua toxicidade.

Os testes de toxicidade aguda evidenciaram a sensibilidade ao cloro em bactérias desnitrificantes apresentando uma IC50 de  $42,91 \text{ mg Cl}_2\text{L}^{-1}$  em experimentos utilizando concentrações celulares iniciais de  $1,77 \text{ g SSV.L}^{-1}$  e pH de 7,3.

Contudo, a exposição de diferentes concentrações celulares a uma mesma concentração de cloro (IC50 verificada nos experimentos anteriores) evidenciou que o cloro inativa uma quantidade de biomassa fixa, e não um percentual como é pressuposto no conceito de IC50. Portanto, a magnitude dos efeitos tóxicos do cloro sobre uma dada população microbiana está mais relacionada à relação entre as concentrações de cloro e biomassa do que à concentração do cloro isoladamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**. 21. Washington: American Public Health Association, 2005.
2. AZEVEDO NETTO, J. M. **Técnica de abastecimento e tratamento de água**. 2 ed. rev. São Paulo: Cetesb, Ascetesb, 1976.
3. CAMPOS, J. L. et al. Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 141-148, 1999.
4. CERVANTES, F. J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution**. London: IWA Publishing, 2009.
5. GERARDI, M. H. **Wastewater Bacteria**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.
6. MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, p. 99-110, 1994.
7. MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. E. Blucher, 1972.
8. SCHMIDELL, W.; REGINATTO, V. Processos de Eliminação de Nitrogênio. In: SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M., et al (Ed.). **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. 1 ed. Florianópolis: Gráfica Paperprint, 2007. cap. VI.2, p.449-508.
9. VISHNIAC, W.; SANTER, M. The *thiobacilli*. **Bacteriology Review**, v. 21, n. 3, p. 195-213, 1957.
10. ZDRADEK, C. P.; SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M. Determinação da concentração de sólidos totais: comparação entre os resultados obtidos em estufa convencional e em forno microondas. In: **XI MET - Encontro Nacional de Metodologias de Laboratório, SCBrasil**. : 36 p. 2006.