

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

JACKELINE VALENDOLF NUNES

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE
CELULOSE KRAFT POR PROCESSO DE BIOAUMENTAÇÃO COM
BACTÉRIAS ISOLADAS DE LAGOA AERADA FACULTATIVA PARA
REMOÇÃO DE COMPOSTOS ESPECÍFICOS**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2021**

JACKELINE VALENDOLF NUNES

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE
CELULOSE KRAFT POR PROCESSO DE BIOAUMENTAÇÃO COM
BACTÉRIAS ISOLADAS DE LAGOA AERADA FACULTATIVA PARA
REMOÇÃO DE COMPOSTOS ESPECÍFICOS**

**Assessment of Kraft effluent treatment by bioaugmentation process with isolated
bacteria from aerated facultative lagoon to remove specific compounds**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para a obtenção de título de mestre.

Área de concentração: Tecnologias e Processos Ambientais

Orientadora: Prof^ª. Dra. Claudia Regina Xavier

**CURITIBA
2021**



[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



JACKELINE VALENDOLF NUNES

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE CELULOSE KRAFT POR
PROCESSO DE BIOAUMENTAÇÃO COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE LAGOA AERADA FACULTATIVA
PARA REMOÇÃO DE COMPOSTOS ESPECÍFICOS**

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

Data de aprovação: 14 de Maio de 2021

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

Prof Gustavo Henrique Couto, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Soledad Chamorro Rodriguez, Doutorado - Ust - Universidad Santo Tomas

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por ter me proporcionado a vida e me capacitado para chegar até aqui. Por toda força, amparo e alegria nos momentos que passei. Sei que sem Deus eu não teria conquistado o que conquistei. Obrigada Deus por ser meu ponto de paz, meu alicerce e meu refúgio.

Agradeço imensamente aos meus pais, Silas e Lurdes, por terem permitido a minha vinda a Curitiba para fazer um Mestrado. Agradeço por todo apoio psicológico, financeiro e por estarem tão perto mesmo estando nós tão distantes fisicamente. Obrigada pai e mãe por me ensinarem a viver neste mundo da maneira mais digna possível e por me apoiarem na caminhada científica, amo muito vocês e sinto muitas saudades.

Agradeço também ao meu companheiro e amor da minha vida, Rhulio, por estar comigo em todas as situações que tive e tenho na vida, por me animar, me apoiar e me ajudar quando estou errada. Aprendi e aprendo muito com você diariamente, você é minha alegria e um dos motivos por eu querer me aprimorar na minha área. Obrigada Deus por ter o Rhulio comigo. Que continuemos com nossos corações intencionados ao Senhor. Te amo para sempre.

Quero agradecer também a minha segunda família Clarice e Dorival, que há 10 anos fazem parte da minha vida e que sempre me apoiaram. Eles que me deram o melhor presente, meu companheiro Rhulio, e também me apresentaram a Jesus, que sem dúvidas foi o momento mais feliz e inesquecível da minha vida.

Agradeço a minha orientadora, professora doutora Cláudia Regina Xavier, por ter me orientado e permitido em fazer uma pesquisa fantástica, que me possibilitou crescer cientificamente. Faço questão de escrever professora doutora, pois a senhora merece muito este título. Obrigada por ser exatamente assim como a senhora tem sido para nós.

Agradeço a todos que passaram na minha vida durante todos esses anos, minhas amigas da UFMT, meus professores da graduação, do Mestrado. Agradeço a vocês por terem me ensinado e me ajudarem a seguir meus sonhos. Que Deus abençoe cada um de nós.

Meu agradecimento também vai ao nosso grupo de pesquisa, o GTEF, por todo apoio que tive desde o começo do Mestrado, aprendendo a fazer as análises, a operar meu reator, a auxiliar nas análises de microbiologia e até mesmo a escrever a Dissertação. Nosso grupo é muito especial e desejo sucesso a todos.

E também agradeço a indústria de papel e celulose pelo aporte financeiro para realizar a pesquisa, no qual o presente trabalho foi realizado com apoio da Codelpa – Companhia de Papel e Celulose do Paraná – por meio do ACT 02/2019 (Acordo de Cooperação Técnica).

*“Só podemos conquistar nossos sonhos com muito estudo e
dedicação no que fazemos.”*

(Faust Lira)

RESUMO

NUNES, J. V. **Avaliação do tratamento de efluente de indústria de celulose Kraft por processo de bioaumentação com bactérias isoladas de lagoa aerada facultativa para remoção de compostos específicos.** 117 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2021.

Neste estudo foi avaliado o tratamento do efluente Kraft por processo de bioaumentação com bactérias isoladas, selecionadas e cultivadas com capacidade de remover compostos específicos baseado em um sistema de tratamento por lagoa aerada facultativa (LAF). As LAFs foram operadas com carga orgânica volumétrica (COV) de 0,2 e 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹, chamadas de Fase I e Fase II respectivamente, por um período de 120 dias. Avaliou-se a eficiência pela remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), demanda química de oxigênio (DQO), carbono orgânico total (COT), cor, turbidez, compostos fenólicos totais (CFT) e compostos derivados de lignina. Além disso, foram realizadas análises de matriz de excitação e emissão de fluorescência (MEEF), do desenvolvimento da biomassa através dos sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV), de ecotoxicidade aguda do afluente e efluente do tratamento e análise da diversidade microbológica em termos de bactérias presentes nos sistemas. Foi possível observar que as remoções de matéria orgânica em termos de DBO₅, DQO e COT foram eficientes nas duas fases, alcançando um total de 94%, 51% e 49% (Fase I) e 80%, 44% e 41% (Fase II) respectivamente. A cor e os CFT não foram expressivamente removidos durante o tratamento biológico. A turbidez teve remoção de 94% na Fase I e de 87% na Fase II. Contudo, os compostos derivados de lignina tiveram remoção média de 13% na Fase I e de 27% na Fase II. A partir da análise de MEEF observou-se a diminuição de intensidade de emissão de compostos fluorogênicos presentes nas amostras do efluente tratado. A biomassa atingiu uma razão SSV/SST de 0,67 na Fase I e de 0,62 na Fase II após 60 dias de operação em cada uma das lagoas. Não foi observada toxicidade aguda nas amostras industriais antes ou após o tratamento. Foram identificadas 9 espécies de bactérias na Fase I e 12 espécies na Fase II por similaridade estatística. Dos microrganismos identificados, os isolados ou combinados (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus glucanolyticus*), ambos associados à biomassa, se mostraram eficientes apresentando remoção de cor em 69%, 48%, 38% e 45% respectivamente e CFT em 37%, 21%, 8% e 13% respectivamente. Esse desempenho superou aquele exclusivo da biomassa, indicando que as espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus glucanolyticus* foram eficazes no tratamento de compostos específicos do efluente de celulose.

Palavras-chave: Bioaumentação. Compostos recalcitrantes. Efluente de celulose Kraft. PCR. Tratamento biológico.

ABSTRACT

NUNES, J. V. **Assessment of Kraft effluent treatment by bioaugmentation process with isolated bacteria from aerated facultative lagoon to remove specific compounds.** 117 p. Master's dissertation. Graduated Program in Environmental Science and Technology – Federal University of Technology – Paraná. Curitiba, 2021.

In this study, the treatment of Kraft effluent was evaluated by a bioaugmentation process with isolated, selected and cultured bacteria capable of removing specific compounds based on an aerated facultative lagoon (AFL) treatment system. The AFL were operated with organic load rate (OLR) of 0.2 and 0.6 kg COD m⁻³ d⁻¹, called Phase I and Phase II respectively, for a period of 120 days. The efficiency was assessed by the removal of biochemical oxygen demand (BOD₅), chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), color, turbidity, total phenolic compounds (TPC) and compounds derived from lignin. Analyses of fluorescence excitation-emission matrix (EEM), biomass development through total and volatile suspended solids (TSS and VSS), acute ecotoxicity of the affluent and effluent of the treatment and microbiology diversity were performed. It was possible to observe that the removal of organic matter in terms of BOD₅, COD and TOC were efficient in both phases, reaching a total of 94%, 51% and 49% (Phase I) and 80%, 44% and 41% (Phase II) respectively. Color and TPC were not significantly removed during biological treatment. Turbidity was removed by 94% in Phase I and 87% in Phase II. However, compounds derived from lignin had an average removal of 13% in Phase I and 27% in Phase II. From the EEM analysis, it was observed a decrease in the intensity of emission of fluorogenic compounds present in the treated effluent samples. The biomass reached an VSS/TSS ratio of 0.67 in Phase I and 0.62 in Phase II after 60 days of operation of each AFL. No acute toxicity was observed in industrial samples before or after treatment. Nine bacterial species were identified in Phase I and 12 species in Phase II due to statistical similarity. Of the microorganisms identified, isolated or combined ones (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Paenibacillus glucanolyticus*), both associated with biomass, proved to be efficient with color removal in 69%, 48%, 38% and 45% respectively and TPC by 37%, 21%, 8% and 13% respectively. This performance surpassed that exclusive to biomass, indicating that the species *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Paenibacillus glucanolyticus* were effective in the treatment of specific cellulose effluent compounds.

Key-words: Bioaugmentation. Biological treatment. Kraft effluent. PCR. Recalcitrant compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da produção de celulose e papel.....	17
Figura 2 – Modelo da composição química da madeira.....	19
Figura 3 - Esquema da obtenção da celulose Kraft	20
Figura 4 - Esquema da aeração de uma lagoa aerada facultativa	25
Figura 5 - Ensaio de ecotoxicidade com amostra de efluente Kraft	37
Figura 6 - Fluxograma das atividades realizadas durante o tratamento por lagoa aerada facultativa	39
Figura 7 - Esquema da LAF de bancada.....	39
Figura 8 - Análises realizadas na identificação das bactérias.....	41
Figura 9 - Bacilos da coloração de Gram vistos em aumento de 400x	41
Figura 10 – Resultados da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 16S rDNA dos isolados	44
Figura 11 - Esquematização dos ensaios de bioaugmentação	46
Figura 12 - Ensaio de bioaugmentação	46
Figura 13 - Parâmetros de controle da LAF	49
Figura 14 - Remoção de matéria orgânica em relação a DBO ₅ e DQO	50
Figura 15 - Avaliação de remoção dos compostos específicos, cor e turbidez	52
Figura 16 - Crescimento da biomassa nas LAFs	55
Figura 17 - Matriz de excitação e emissão de fluorescência do afluente e efluente da lagoa	56
Figura 18 - Árvore filogenética da espécie <i>Bacillus cereus</i>	60
Figura 19 - Resultados da bioaugmentação	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas e eficiência de tratamentos de efluentes de celulose.....	23
Tabela 2 - Tratamento de efluente de celulose e papel por lagoa aerada e lagoa aerada facultativa	26
Tabela 3 - Espécies de bactérias identificadas e suplementadas no tratamento biológico do efluente da indústria de celulose e papel	28
Tabela 4 - Padrões de lançamento de efluente líquido	33
Tabela 5 - Caracterização físico-química do efluente e da biomassa.....	35
Tabela 6 - Total de ensaios de bioaugmentação	47
Tabela 7 - Caracterização do efluente da indústria de celulose.....	48
Tabela 8 - Comparação de parâmetros entre lagoas aeradas facultativas.....	54
Tabela 9 - Critérios de lançamento do efluente.....	58
Tabela 10 - Bactérias cultiváveis identificadas nas LAFs.....	59
Tabela 11 - Eficiência do tratamento de compostos específicos na bioaugmentação	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOXs – do inglês *Adsorbable Organic Halogens*
AR – Ácido Resínico
Bc – *Bacillus cereus*
Bt – *Bacillus thuringiensis*
CA – Compostos Aromáticos
CEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CFT – Compostos Fenólicos Totais
CIA – Clorofórmio:álcool isoamílico
CL – Compostos Lignínicos
CLS – Compostos Lignossulfônicos
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT – Carbono Orgânico Total
COV – Carga Orgânica Volumétrica
CTPM – do inglês *Chemical Thermal Mechanical Pulping*
DBO₅ – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA – do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
dNTPs – desoxinucleotídeos trifosfato
DQO – Demanda Química de Oxigênio
FT – Fator de Toxicidade
IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores
IF – Intensidade de Fluorescência
LAF – Lagoa Aerada Facultativa
LAMAQ – Laboratório Multiusuário de Análises Químicas
LATAR – Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias
LB – Luria Bertani
MBBR-APG – do inglês *Moving Bed Biofilm Reactor* com AQUAPOROUSGEL®
MEEF – Fluorescência em Matriz de Excitação-Emissão
NB – do inglês *Nutrient Broth*
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
OD – Oxigênio Dissolvido
ORP – do inglês *Oxidation Reduction Potential*
Pb gluc. – *Paenibacillus glucanolyticus*
PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*
RSB – Reator Sequencial em Batelada
SS – Sólidos Suspensos
SST – Sólidos Suspensos Totais
SSV – Sólidos Suspensos Voláteis
TDH – Tempo de Detenção Hidráulica
UASB – do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors*
UFC - Unidade Formadora de Colônia
UFPR – Universidade Federal do Paraná
UNT – Unidades Nefelométricas de Turbidez
USEPA – do inglês *United States Environment Protection Agency*
UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV – Ultravioleta
Vis – Visível

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2.OBJETIVOS	16
2.1.Objetivo geral	16
2.2.Objetivos específicos	16
3.REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1.A indústria de celulose no Brasil	17
3.2.Características da madeira e processo de celulose Kraft	18
3.2.1.Composição química da madeira.....	18
3.2.2.Processo de obtenção da celulose Kraft	19
3.3.Efluente de celulose da polpação Kraft	21
3.3.1.Características do efluente de celulose Kraft	21
3.3.2.Tratamentos do efluente de celulose	21
3.4.Tratamento por lagoas de estabilização	24
3.5.Bactérias com potencial de remoção de compostos específicos do efluente Kraft	27
3.6.Processo de biorremediação	30
3.7.Testes de ecotoxicidade	31
3.8.Legislação ambiental relativa à efluentes líquidos	33
4.METODOLOGIA	34
4.1.Coleta, transporte e caracterização do efluente de celulose Kraft	34
4.2.Sequência de atividades desenvolvidas	38
4.3.Sistema de tratamento por lagoa aerada facultativa	39
4.4.Análise microbiológica	40
4.5.Ensaio de bioaugmentação	44
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1.Coleta e caracterização do efluente bruto de celulose Kraft	48
5.2.Operação da lagoa aerada facultativa de bancada	48
5.3.Avaliação da remoção da matéria orgânica da LAF	50
5.5.Razão de C:N:P e a performance de lagoas aeradas	53
5.6.Análise da biomassa	54
5.7.Análise de matriz de excitação e emissão de fluorescência (MEEF)	55
5.8.Análise de ecotoxicidade	57

5.9.Análise dos critérios de lançamento.....	57
5.10.Identificação das bactérias contidas no efluente.....	58
5.11.Ensaio de bioaugmentação	60
5.11.1.Avaliação da remoção da matéria orgânica e de compostos específicos no ensaio de bioaugmentação	61
6.CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE A – Dados da COV 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹.....	75
APÊNDICE B – Dados da COV 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹.....	83
APÊNDICE C – Curva analítica de cor.....	91
APÊNDICE D – Sequências genéticas das bactérias identificadas .	93
APÊNDICE E – Árvores filogenéticas das espécies de bactérias identificadas	106

1. INTRODUÇÃO

As indústrias de celulose e papel são importantes para a economia mundial bem como para a economia brasileira. No ano de 2019 a produção brasileira de celulose alcançou 19,7 milhões de toneladas, encontrando-se em segundo lugar no ranking mundial. Em relação a produção de papel, o Brasil gerou 10,5 milhões de toneladas (IBÁ, 2020).

Consequentemente, o setor de produção de celulose e papel tem como característica o alto consumo de água em seus processos, com variação industrial de 200 m³ por tonelada produzida de acordo com o material final. Entretanto, com o desenvolvimento tecnológico, atualmente este setor tem reduzido expressivamente a quantidade de água utilizada para cerca de 22-40 m³ por tonelada de celulose produzida, preservando aproximadamente 75% de água de captação para o processo (HUBBE et al., 2016; IBÁ, 2020). Como consequência, tem-se a geração de efluentes da mesma ordem de razão de água consumida, o qual tem elevado potencial de contaminação ambiental devido a concentração destes contaminantes no mesmo (KAMALI; KHODAPARAST, 2015; PEITZ; XAVIER, 2020).

Um dos processos mais utilizados para a produção de celulose é o processo Kraft. Neste método a madeira é cozida com hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio (Na₂S). O resíduo desse processo retirado durante a lavagem das fibras de celulose contém alta concentração de matéria orgânica, cor, demanda química de oxigênio (DQO), além de compostos recalcitrantes que são de difícil degradação e compostos fenólicos de elevado peso molecular, os quais se forem lançados sem o devido tratamento, causam impactos ambientais no meio ambiente (DYKSTRA et al., 2015; PEITZ; XAVIER, 2020).

Para um bom tratamento do efluente de celulose, empregam-se sistemas como biológicos, processos físico-químicos, adsorção, oxidação avançada e filtração por membrana (MAJUMDAR et al., 2019). Entretanto, estes métodos, salvo os biológicos, são de alto custo e a sua inclusão pode ter limitações econômicas que muitas vezes inviabilizam sua aplicação (KAMALI; KHODAPARAST, 2015; KAMALI et al., 2019).

Os sistemas de lodos ativados e lagoas aeradas facultativas (LAF) são os sistemas mais empregados no tratamento biológico de efluentes de indústrias de celulose e papel (BAILÓN-SALAS et al., 2017; KAMALI; KHODAPARAST, 2015; LEWIS et al., 2018). Neste sentido, as LAFs são largamente utilizadas no Brasil pela condição climática favorável que propiciam o crescimento de microrganismos capazes de realizarem o tratamento do efluente, e pela grande disponibilidade de área para construção desses sistemas (VON SPERLING, 2016).

Além disso, as LAFs têm como vantagem serem de simples manutenção, baixo custo e podem remover cerca de 80-95% da demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) e 40-60% de demanda química de oxigênio. Outra vantagem importante da LAF é que elas são consideradas estáveis a choques de cargas, distribuindo o excedente na sua extensão, além de apresentar tempos de detenção hidráulica (TDH) altos (2 a 10 dias) (SUBASHINI, 2015; SWAMY et al., 2011).

Os processos biológicos podem ser melhorados por meio da bioaugmentação de bactérias, sendo considerados tecnologias sustentáveis por terem uma boa relação custo-benefício (HOSSAIN; ISMAIL, 2015). O desafio é selecionar a espécie ótima que será capaz de degradar a matéria orgânica e compostos específicos do efluente da indústria de celulose e papel (BAILÓN-SALAS et al., 2017; GHRIBI et al., 2016).

A associação da bioaugmentação com bactérias autóctones presentes em sistemas de LAF é uma alternativa para as indústrias, comparativamente com outros tipos de tratamento, pois o custo do tratamento com estes microrganismos está relacionado à reação química realizada por cada microrganismo (CHANDRA et al., 2011). Dentre estas, por exemplo, as bactérias identificadas como *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus parabrevis*, *Paenibacillus* sp. e *Serratia liquefaciens* são usadas industrialmente por produzirem enzimas que podem degradar compostos recalcitrantes e cor do efluente de celulose Kraft (CHANDRA et al., 2008; HOODA et al., 2018; RAJ et al., 2014; SALEEM et al., 2014; SINGH et al., 2019; SONKAR et al., 2019).

Neste contexto, alguns estudos apontam o uso das bactérias para o tratamento de compostos específicos, como compostos fenólicos totais e derivados de lignina, presentes no efluente da indústria de celulose. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a tratabilidade de efluente de indústria de celulose Kraft por processo biológico assistido por bactérias isoladas, selecionadas e identificadas de um sistema de LAF com capacidade de remover compostos específicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o tratamento do efluente de indústria de celulose Kraft por processo biológico assistido por bactérias autóctones isoladas, selecionadas e identificadas com capacidade de remover compostos específicos contidos neste efluente.

2.2. Objetivos específicos

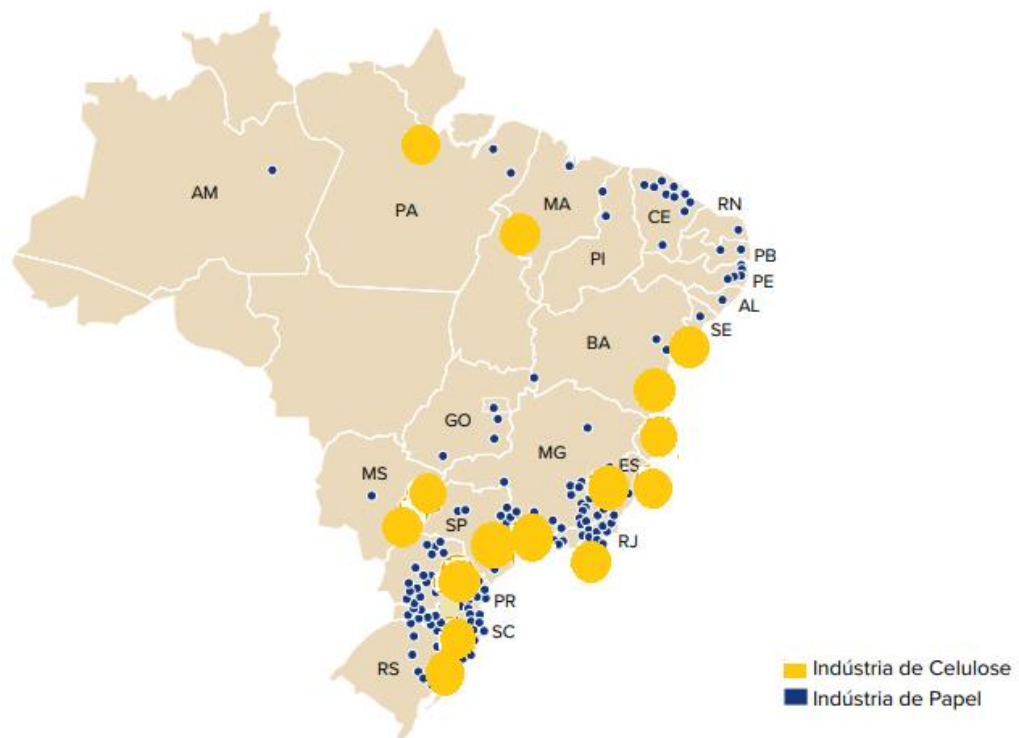
- Desenvolver e operar uma lagoa aerada facultativa (LAF) em escala de bancada nas cargas orgânicas volumétricas (COV) de 0,2 e 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹ para avaliar a diversidade bacteriana 16s do efluente de celulose Kraft.
- Avaliar a eficiência do tratamento em função da redução nos parâmetros de demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), demanda química de oxigênio (DQO), carbono orgânico total (COT), ecotoxicidade aguda em *Daphnia magna* na presença de grupos de bactérias com potencial para uso na remoção de compostos específicos por processo de bioaumentação.
- Isolar as bactérias da mistura de biomassa e efluente nas condições de estabilidade dos sistemas.
- Identificar as bactérias por sequenciamento genético e propor condições adequadas para o tratamento do efluente da indústria de celulose e papel Kraft por meio da bioaumentação com os microrganismos presentes neste efluente.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. A indústria de celulose no Brasil

A indústria de celulose mundial e brasileira tem crescido devido a versatilidade de utilização dos produtos, entre eles papel, absorventes, filtros, embalagens, entre outros (IBÁ, 2020). Em 2019, o Brasil produziu cerca de 19,7 milhões de toneladas de celulose, despontando na segunda posição no ranking mundial (IBÁ, 2020). Esta produção se concentra, principalmente, nas proximidades dos setores consumidores como as regiões Sul e Sudeste do Brasil, como representado na Figura 1.

Figura 1 - Distribuição geográfica da produção de celulose e papel



Fonte: Adaptado de IBÁ (2020).

Os tipos mais comuns de árvores plantadas no Brasil para essa produção são Pinus e Eucalipto, podendo haver outros tipos sendo utilizados pelos estados brasileiros, como por exemplo, Acácia, Teca, Seringueira e Paricá (SEBOK, 2017). Entretanto, a árvore Eucalipto é a mais plantada no país, pelo clima e condições edáficas favoráveis no Brasil (IBÁ, 2020).

3.2. Características da madeira e processo de celulose Kraft

3.2.1. Composição química da madeira

A produção de celulose envolve a separação das fibras vegetais da madeira (GAUTO; ROSA, 2013). A madeira é um compósito natural constituído por celulose (40-45%), hemicelulose (20-30%), lignina (20-30%) e derivados ou extrativos da madeira (5-7%) (MENEZES, 2017).

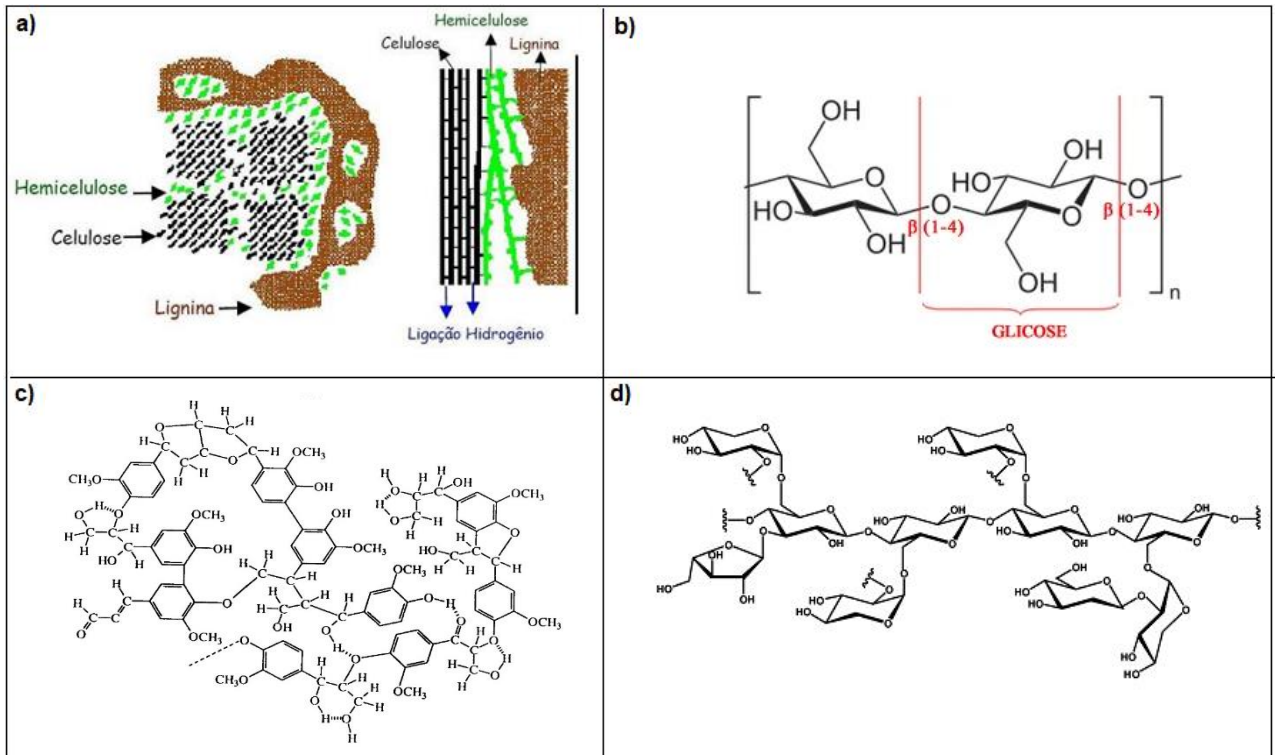
Na Figura 2 (a) está representado um corte longitudinal e transversal da madeira em que se pode ver a lignina representada pela cor marrom e mais externa à madeira, além da hemicelulose juntamente com a celulose que formam microfibrilas (SILVA, 2006).

Na Figura 2 (b) está representada a celulose, que é um polímero linear de glicose com alto peso molecular. Ela possui ligações beta-1,4 glicosídicas entre os monômeros de glicose, é insolúvel em água e compõe a base da estrutura da madeira.

Na Figura 2 (c) está representando um modelo da lignina, que é constituída por polímeros amorfos complexos. Ela confere rigidez na parede celular da madeira e produz coloração marrom, característica do efluente gerado.

Na Figura 2 (d) está representada a hemicelulose que é basicamente uma mistura de polissacarídeos de baixo peso molecular, está associada à celulose na parede celular e confere estrutura para a madeira (GAUTO; ROSA, 2013).

Figura 2 – Modelo da composição química da madeira



Nota: a) corte longitudinal e transversal da madeira. b) estrutura polimérica da celulose. c) modelo representativo da lignina. d) estrutura polimérica da hemicelulose.

Fonte: a) e c) Gauto e Rosa, 2013, b) Silva (2006) e d) Donate (2014).

Além destes, há a presença de diversos compostos orgânicos que podem ser extraídos, tais como: terpenos, fenóis, ácidos graxos, ácidos resínicos e fitoesteróis, os chamados extrativos da madeira, compondo de 5-7% (SWAMY et al., 2011; PEITZ; XAVIER, 2020).

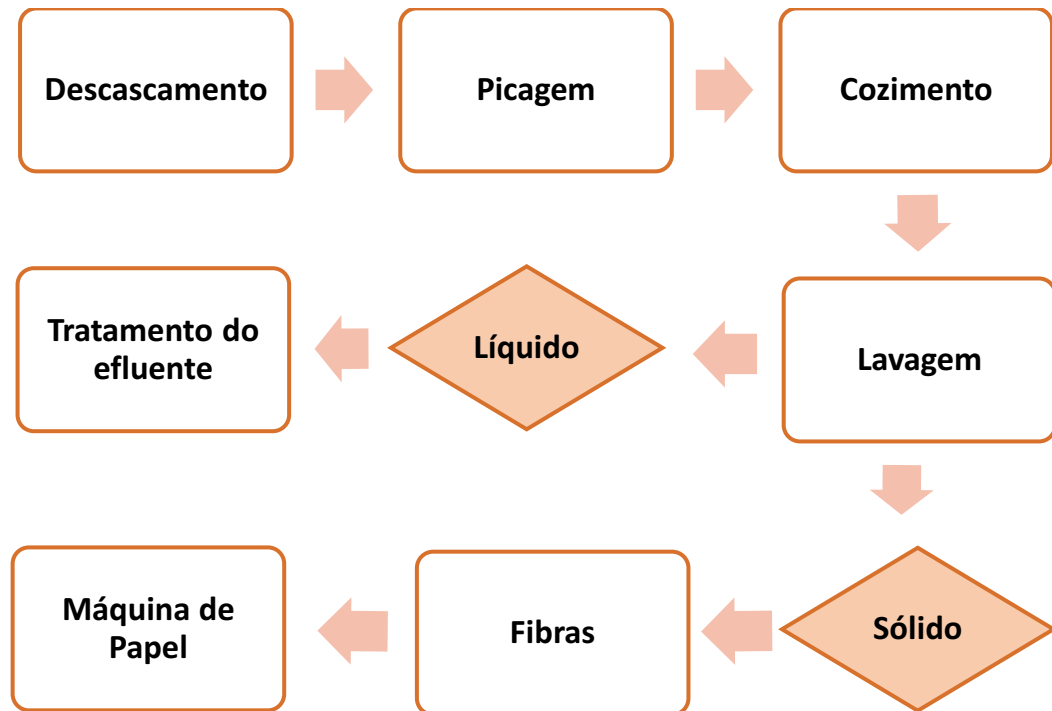
3.2.2. Processo de obtenção da celulose Kraft

Para a produção de celulose, têm sido empregados diversos processos de polpação incluindo os mecânicos, químicos, termomecânicos ou quimiotermodomecânico – CTPM (*Chemical Thermal Mechanical Pulping*) (GRÖTZNER et al., 2018). Estes processos têm como principal objetivo separar lignina e hemicelulose da celulose para produção das fibras.

O processo de polpação Kraft é o mais amplamente utilizado no mundo, e no Brasil representa mais de 90% da celulose obtida. Nele, o rendimento médio de celulose no processo de polpação é de 50% (SANTOS et al., 2016). A produção industrial de celulose Kraft utiliza soluções alcalinas, visando dissolver a lignina, hemicelulose e os constituintes não celulósicos, preservando a resistência das fibras para sua individualização e obtendo dessa maneira uma

pasta escura (GAUTO; ROSA, 2013). Na Figura 3 há um esquema da obtenção da celulose Kraft.

Figura 3 - Esquema da obtenção da celulose Kraft



Fonte: Autoria própria (2021).

Na Figura 3, observa-se que a primeira etapa para a produção do papel é a preparação da madeira, na qual é feito o descascamento e lavagem das toras que vão para o picador para serem transformadas em cavacos (pequenos pedaços de madeira), melhorando a etapa de cozimento pelo aumento da área de superfície (GAUTO; ROSA, 2013).

O cozimento é a etapa seguinte na qual os cavacos são sujeitos ao licor branco e vapor d'água dentro de digestores industriais, para separar a lignina das fibras da madeira. Nesta etapa são empregados o NaOH e o Na₂S como agentes ativos na reação (ALVES et al., 2015).

Após o cozimento, ocorre a etapa de lavagem das fibras que tem como objetivo separar as fibras e o licor negro remanescente entre elas. Origina-se desta forma um efluente (líquido) impregnado com lignina, hemicelulose e outros compostos solubilizados durante o cozimento, o qual é encaminhado para o processo de tratamento, enquanto as fibras (sólido) são enviadas para as outras etapas como branqueamento e secagem na fabricação de fibra branqueada ou do papel, passando pela máquina de papel (HUBBE et al., 2016).

3.3. Efluente de celulose da polpação Kraft

3.3.1. Características do efluente de celulose Kraft

Há uns anos atrás, a indústria de celulose costumava estar associada a um elevado consumo de água. Nos últimos anos esse consumo tem diminuído, atualmente se empregam de 22-40 m³ de água por tonelada de celulose produzida, preservando aproximadamente 75% de água de captação para a produção (IBÁ, 2020). Neste sentido, o que se almeja é um reaproveitamento de água e de produtos químicos, mas as indústrias brasileiras ainda não possuem esta prática como indicado no estudo de Suhr et al. (2015) publicado em um documento de referência para a produção de celulose, papel e cartão, da Comissão Europeia.

As águas residuárias de celulose apresentam concentrações de matéria orgânica em termos de DQO, DBO₅, sólidos suspensos (SS), compostos recalcitrantes, como os compostos orgânicos halogenados (AOXs), oriundos de processos de branqueamento, ou ainda os compostos lignínicos (CL), cor e extrativos (HUBBE et al., 2016; KAMALI et al., 2019). No caso de efluentes que passam pela etapa de branqueamento, a ecotoxicidade crônica está relacionada com os compostos orgânicos halogenados (CABRERA, 2017).

Por conta dessas características, este efluente quando não tratado adequadamente pode causar impactos nos ecossistemas aquáticos dos corpos receptores dessas descargas, devido à alta demanda de oxigênio (DBO₅ da ordem de 40 mg O₂ L⁻¹) e as alterações na transparência da água afetando a penetração de luz no meio, além da toxicidade causada em peixes e demais animais aquáticos (HUBBE et al., 2016). Estudos apontam o impacto causado pelos resíduos da degradação do efluente de celulose, os quais podem gerar produtos com poder de desregulação endócrina (fitoesteróis) e compostos fenólicos de alto peso molecular entre 500 a 3000 Daltons (unidade de medida de massa utilizada para expressar a massa de partículas atômicas) (DYKSTRA et al., 2015; PEITZ; XAVIER, 2020).

Dessa maneira, para a proteção do meio ambiente, e para satisfazer as exigências legais, como a Resolução CONAMA n° 430/2011, é necessário que a indústria faça o tratamento do seu efluente para adequá-los aos padrões de lançamento (BRASIL, 2011).

3.3.2. Tratamentos do efluente de celulose

No Brasil a Resolução n° 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) impõem limites de lançamento de efluentes em corpos hídricos, de maneira a

preservar o meio ambiente (BRASIL, 2011). No estado do Paraná, as indústrias fazem uso de diferentes tecnologias de tratamento para redução dos valores de parâmetros físico-químicos relacionados à impactos ambientais, como DBO₅, DQO, turbidez, cor, toxicidade, entre outros visando se adequar às legislações vigentes (BRASIL, 2009). Os tratamentos baseados em processos biológicos são os mais frequentemente utilizados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente transformando compostos orgânicos em CO₂ e H₂O em sistemas aeróbios, ou CH₄ e CO₂ em sistemas anaeróbios, com custos relativamente baixos. Esses sistemas operam sob condições controladas, com alta carga orgânica aplicada gerando assim altas taxas de conversão (KAMALI; KHODAPARAST, 2015).

Na Tabela 1 estão apresentados alguns estudos de processos empregados para tratar efluente de indústria de celulose.

Tabela 1 - Sistemas e eficiência de tratamentos de efluentes de celulose

Sistema de tratamento	Parâmetros	Eficiência (%)	Autores
Coagulação-Floculação-Sedimentação	Cor	98	Farias; Ferreira (2014)
	Turbidez	99	
Fungos da podridão branca	Cor	25-46	Freitas et al. (2009)
	DQO	74-81	
Lagoa aerada facultativa	CL	30	Machado et al. (2018)
	Cor	20	
	DBO ₅	86	
	DQO	52	
Lodos ativados	CL	20	Castro et al. (2019)
	Cor	10	
	DBO ₅	92	
	DQO	52	
MBBR-APG	CFT	-109	Melchioris (2019)
	CL	39	
	Cor	-35	
	COT	50	
	DBO ₅	62	
	DQO	46	
RSB	CFT	35	Duarte et al. (2018)
	Cor	7	
	DBO ₅	92	
	DQO	57	
UASB	DQO	78	Buzzini; Pires (2007)
Ultra-filtração	CFT	27	Follmann (2017)
	CL	33	
	Cor	44	
	DQO	66	
<i>Wetland</i> construído	AOX	89	Choudhary et al. (2013)
	CFT	67	

Nota: MBBR-APG – reator biológico de leito móvel com suporte esponjoso; RSB – reator sequencial em batelada; UASB – reator anaeróbio de fluxo ascendente. *Wetland* – banhados ou pântanos. Valores negativos indicam incremento do parâmetro. AOX – compostos orgânicos halogenados. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. COT – carbono orgânico total. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio.

Os sistemas aeróbios evoluíram com o desenvolvimento dos lodos ativados, filtros biológicos, lagoas aeradas, dentre outros. Diversas inovações vêm sendo propostas ao longo

dos anos a fim de aperfeiçoar estes processos, reduzindo gastos com energia e aumentando a eficiência no tratamento. Dentre as inovações destacam-se filtros biológicos de material biodegradável, pré e pós tratamentos por ozonização do efluente, por processos avançados de oxidação, ultrafiltração por membranas, coagulação e tratamentos físico-químicos (CABRERA, 2017; LEWIS et al., 2018).

3.4. Tratamento por lagoas de estabilização

As lagoas de estabilização são sistemas de tratamentos biológicos utilizados em países com extensão de área disponível para sua implantação. Elas são de simples operação e manutenção, além de serem estáveis frente a choques de cargas, devido, principalmente a suas dimensões que distribuem a carga aplicada (SUBASHINI, 2015; SWAMY et al., 2011). Dentre as lagoas aeradas facultativas tem-se as seguintes versões: lagoa aerada, lagoa facultativa, lagoa aerada de mistura completa, lagoa aerada facultativa, lagoa de decantação, lagoa anaeróbia e lagoa de maturação (VON SPERLING, 1996).

As lagoas aeradas são sistemas de tratamento biológico simples e de baixo custo, comparando-se com outras metodologias como os lodos ativados e o reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB). São aeradas mecanicamente para manter a oxigenação e também para manter os sólidos separados do líquido.

As lagoas aeradas de mistura completa também suportam alta carga de matéria orgânica (DBO_5 acima de $300 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), que estão dispersas no meio líquido ou em mistura completa, favorecendo assim a remoção de matéria orgânica biodegradável no sistema. Entretanto, possuem alto teor de sólidos suspensos (METCALF; EDDY, 2016).

Para separação destes sólidos são usadas as lagoas de decantação. Nela as profundidades superiores a 3 metros permitem o acúmulo de lodo durante um longo período, que pode ser superior a 5 anos em alguns casos (VON SPERLING, 1996).

As lagoas anaeróbias são muito profundas variando de 3 a 5 metros de profundidade e esta característica está relacionada com a redução da penetração da luz no sistema. O tratamento é feito com alta carga de matéria orgânica, onde os microrganismos transformam a matéria orgânica em gás carbônico e metano (JORDÃO; PESSOA, 2016).

As lagoas de maturação têm como objetivo principal a remoção de organismos patogênicos, como os coliformes e são mais rasas para melhorar a eficiência dos mecanismos

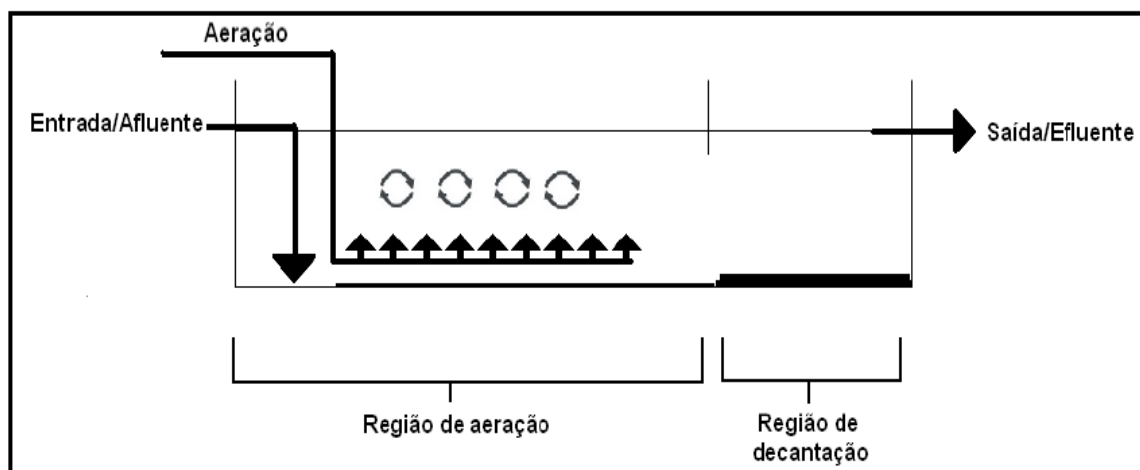
de escassez de alimento, elevado pH e radiação ultravioleta (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1996).

Nas lagoas estritamente facultativas o oxigênio requerido pelos microrganismos provém da fotossíntese das algas e as bactérias possuem caráter aeróbio e anaeróbio. Elas são estratificadas em camadas onde o componente superior é a zona aerada, seguida da zona facultativa e no fundo da zona anaeróbia na superfície do sedimento (JORDÃO; PESSOA, 2016).

Na lagoa aerada facultativa o oxigênio é advindo de aeração mecanizada com aeradores dispostos na primeira porção da lagoa, percorrendo o sistema longitudinalmente até a zona de sedimentação próxima a saída da LAF. O grau de energia introduzido visa apenas oxigenação, não sendo suficiente para a manutenção dos sólidos em suspensão e bactérias dispersos na massa líquida, possibilitando a sedimentação da matéria orgânica (lodo de fundo) que acaba por ser estabilizada anaerobicamente (NUNES, 2012; VON SPERLING, 2014).

No Brasil, o tratamento biológico mais difundido para o efluente Kraft são as LAFs, pelo bom rendimento, facilidade de operação e clima favorável para o crescimento de microrganismos (SUBASHINI, 2015; VON SPERLING, 2016). Na Figura 4, há uma representação de aeração em lagoa aerada facultativa.

Figura 4 - Esquema da aeração de uma lagoa aerada facultativa



Fonte: Peitz (2018).

Devido à introdução da mecanização, as lagoas aeradas facultativas são menos simples em termos de manutenção e operação, comparadas com as lagoas facultativas, contudo mais simples de operar comparando-se com lodos ativados, apresentando zona de sedimentação sem

a necessidade de decantador secundário como em lodos ativados (NASRAUI, 2016). Neste sentido, a LAF possui maiores TDH de 2 a 10 dias, e eficiência de 80-95% na remoção de DBO_5 e de 40-60% com relação à DQO de efluente de celulose (SUBASHINI, 2015). A Tabela 2 apresenta alguns autores que trabalharam com lagoas aeradas e lagoa aerada facultativa, com carga orgânica volumétrica (COV) aproximadas as que foram utilizadas neste trabalho.

Tabela 2 - Tratamento de efluente de celulose e papel por lagoa aerada e lagoa aerada facultativa

Parâmetros	COV (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	TDH (d)	Eficiência (%)	Autores
AR			81	Belmonte et al. (2006)
CFT			-18	
Cor	0,6	1,96	-17	
DBO_5			98	
DQO			67	
CFT			20	Chamorro et al. (2009)
DBO_5	0,8	2,2	96	
DQO			65	
Estigmasterol			-30	
DQO	0,15	5,6	64	Dykstra et al. (2015)
Fitoesteróis			83	
CL			30	Machado et al. (2018)
Cor	0,2	3	20	
DBO_5			86	
DQO			52	
CFT			-19	Xavier et al. (2011)
Cor	0,4	2,2	40	
DBO_5			99	
DQO			57	

Nota: Valores negativos indicam incremento do parâmetro. AR – ácido resínico. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. DBO_5 – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio.

Como pode ser visto na Tabela 2, este tipo de tratamento é eficiente na remoção da matéria orgânica biodegradável, removendo mais de 90% da DBO_5 . Entretanto, alguns contaminantes do efluente Kraft, como os compostos lignínicos e seus derivados, persistem devido à sua recalcitrância, atribuindo cor e toxicidade ao efluente mesmo após o tratamento (RABELO, 2005).

Dentre os estudos sobre o tratamento de efluente de celulose por lagoas aeradas destacam-se àqueles sobre seu comportamento frente às modificações de COV e TDH. Também

há um crescente interesse no desenvolvimento de tecnologias mais econômicas e adaptáveis para a atualização e expansão de estações de tratamento de águas residuais existentes. Para isso, novas combinações de tratamento, como o isolamento e cultivo de bactérias com potencial remoção de compostos específicos, tem se mostrado vantajoso na remoção de contaminantes e permite contornar possíveis limitações econômicas e espaciais que possam inviabilizar as ampliações na capacidade de produção e por consequência as estações de tratamento (HOSSAIN; ISMAIL, 2015; HUBBE et al., 2016).

3.5. Bactérias com potencial de remoção de compostos específicos do efluente Kraft

As espécies de bactérias autóctones comumente presentes em tratamentos biológicos de efluente de celulose podem viver em ambientes extremos de temperatura, pH, DBO₅, DQO e baixa concentração de oxigênio (GHRIBI et al., 2016). Neste sentido, as bactérias por terem estas características citadas possuem importância frente ao uso no tratamento do efluente Kraft (HOODA et al., 2018).

Para avaliar o potencial destes microrganismos muitos estudos têm sido realizados. Na Tabela 3 são apresentados alguns estudos realizados com índice (1) para aqueles que fizeram a identificação de bactérias contidas no sistema de tratamento e com índice (2) para aqueles que fizeram a suplementação de bactérias específicas para o tratamento de efluente da indústria de celulose e papel.

Tabela 3 - Espécies de bactérias identificadas e suplementadas no tratamento biológico do efluente da indústria de celulose e papel

Sistema de tratamento	Condições operacionais	Microrganismos	Parâmetros	Eficiência (%)	Autores
Reator sequencial em batelada ¹	pH: 6,0 Temperatura: 30 °C TDH: 3d	<i>Azotobacter</i> sp.	CL	78	Morii et al. (1995)
			Cor	86	
Reator sequencial em batelada ¹	pH: 11,0 Temperatura: 30 °C TDH: 3d	<i>Aeromonas formicans</i>	CL	78	Gupta et al. (2001)
			Cor	86	
			DQO	71	
Isolado ²	pH: 7,6 Temperatura: 30 °C TDH: 6d	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	CL	43	Raj et al. (2007a)
			Cor	58	
N/A ¹	pH: 7,0 – 8,0 Temperatura: 35°C Agitação: 140 rpm TDH: 7d	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Bacillus cereus</i>	CL	95	Chandra et al. (2012)
			Cor	65	
			DQO	63	
			DBO ₅	64	
N/A ¹	pH: 7,6 Temperatura: 34 °C Agitação: 120 rpm TDH: 6d	<i>Paenibacillus</i> sp.	CFT	86	Raj et al. (2014)
			CL	54	
			Cor	68	
			DBO ₅	83	
			DQO	78	
Reator semi-batelada ²	pH: 6,5 Temperatura: 45°C Agitação: 150 rpm TDH: 2,6d	<i>Bacillus cereus</i>	Cor	90	Saleem et al. (2014)
			DQO	61	
			DBO ₅	66	
N/A ¹	pH: N.d. Temperatura: 35 °C Agitação: 140 rpm TDH: 6d	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CL	58	Yadav et al. (2015)
			Cor	82	
			DBO ₅	85	
			DQO	79	
Isolado ²	pH: 6,8 Temperatura: 33 °C Agitação: 120 rpm TDH: 4d	<i>Dysgonomonas</i> sp.	CL	35	Duan et al. (2016)
			DQO	38	

Lagoa aerada ¹	pH: 7,4 – 7,8 Temperatura: 20 °C TDH: N.i.	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Runella sp.</i> <i>Legionella sp.</i>	-	-	Bailón-Salas et al. (2017)
Reator semi-batelada ²	pH: 7,0 – 8,2 Temperatura: 35 °C TDH: 1,3 d	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	CL Cor DQO	42 51 60	Hooda et al. (2018)
Isolado ²	pH: 7,6 Temperatura: 30 °C TDH: 10 d	<i>Serratia liquefaciens</i>	CL Cor DQO AOX CFT	65 62 68 75 88	Singh et al. (2019)
Reator sequencial em batelada ¹	pH: 7,0 Temperatura: 37 °C TDH: 3d	<i>Bacillus sp.</i>	CL Cor COT DQO DBO ₅	64 73 82 86 93	Sonkar et al. (2019)

Nota: ¹ – Bactérias identificadas no sistema de tratamento do efluente. ² – Bactéria suplementada utilizada no processo de tratamento. AOX – compostos orgânicos halogenados. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. COT – carbono orgânico total. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio. N/A – não disponível. TDH – tempo de detenção hidráulico.

A Tabela 3, apresenta alguns estudos de tratamento realizados com bactérias autóctones identificadas por 16s DNA no efluente de celulose, numerado com o índice (1), e as bactérias alóctones suplementadas utilizadas no tratamento, numerado com o índice (2), para a remoção de compostos específicos presentes no efluente como por exemplo, CL e seus derivados, CFT e cor. Assim, estas pesquisas demonstram um bom resultado na tratabilidade utilizando microrganismos autóctones já presentes no efluente de celulose (SONKAR et al., 2019).

Nesta perspectiva, a remoção de compostos específicos pode ser otimizada por meio da bioaugmentação e bioestimulação, empregando condições melhores, como de nutrientes, pH, oxigênio, para o aumento de um grupo selecionado capaz de melhorar a performance do tratamento do efluente de celulose (LIANG et al., 2015; SONKAR et al., 2019).

3.6. Processo de biorremediação

Os tratamentos biológicos compõem os processos de biorremediação, que são definidos pela *American Society for Microbiology* como o uso de organismos vivos para reduzir ou eliminar os riscos ambientais decorrentes da acumulação de produtos químicos tóxicos e outros resíduos perigosos. O interesse na utilização de microrganismos na degradação de poluentes químicos surgiu a partir de 1952, quando Gayle disse que para qualquer composto orgânico existe um microrganismo que pode destruí-lo, se estiver em condições adequadas (ARDELEANU, 2011).

De acordo com Oliveira (2008) a aplicação de processos biotecnológicos envolvendo os microrganismos em consórcio ou individualmente, tem se tornado crescente. Nesse sentido, a grande motivação de pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação é a busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradarem de maneira eficiente um grande número de poluentes com baixo custo operacional, como é o interesse deste trabalho (KUNZ et al., 2002).

Dentro do processo de biorremediação pode existir as seguintes classificações de remediação: atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação.

A atenuação natural é um processo biológico que transforma os poluentes em substâncias menos nocivas ao meio ambiente por meio da biodegradação realizada pelos microrganismos (COLLA, 2012).

A bioestimulação é o processo de melhorar as condições do meio para os microrganismos através da adição de nutrientes, oxigênio, adequação da temperatura, pH, aeração ou potencial de redução. Deste modo, tem-se uma melhora no desempenho dos microrganismos no processo de tratamento (COLLA, 2012).

A bioaugmentação está relacionada ao incremento de bactérias alóctones, que não são nativas ao ambiente, ou de bactérias autóctones, que são nativas ao ambiente, de forma isolada ou em consórcio. Esse processo baseia-se na ação espontânea e controlada de microrganismos para aumentarem a sua quantidade e serem capazes de degradar poluentes do solo, de corpos hídricos e de efluentes industriais e domésticos (ARDELEANU, 2011). Os microrganismos usados também devem atuar em sinergia com as espécies nativas do local, sem interferir nos procedimentos biogeoquímicos naturais (BRAGA, 2018).

Até o ano de 2007, a técnica de bioaugmentação não era utilizada no Brasil pois dependia da concordância e da autorização de órgãos governamentais e de agências de fiscalização ambiental, como a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Porém, em 22 de junho de 2007, a CETESB, através da Decisão de Diretoria nº 103/2007/C/E, autorizou a utilização de microrganismos alóctones na bioaugmentação (CETESB, 2007).

Assim, a bioaugmentação passou a ser permitida no Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, seguindo as normas pertinentes, explicitadas no referido documento. Dentre as normas a serem seguidas, destaca-se a norma técnica da CETESB nº L1.022, que trata sobre o uso de produtos biotecnológicos, constituídos de microrganismos, destinados ao tratamento de efluentes líquidos, de resíduos sólidos e à remediação de solos e de águas (CETESB, 2007).

A bioaugmentação também pode ser utilizada com organismos geneticamente modificados para melhorar o sistema de tratamento. Entretanto, como trata-se de um microrganismo alóctone há uma legislação brasileira que regulamente a utilização destes: Lei de Biossegurança (Lei 11.105/05), em vigência desde 24 de março de 2005 (BRASIL, 2005b).

3.7. Testes de ecotoxicidade

Testes de ecotoxicidade são definidos como procedimentos nos quais respostas de organismos-teste são utilizadas para avaliar a qualidade de cargas de efluentes e outras substâncias. Estes testes são realizados sob condições experimentais específicas, com o intuito de estimar o efeito ecotoxicológico de substâncias isoladas, efluentes industriais e amostras

ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, os organismos-testes são expostos a diferentes concentrações da amostra e os efeitos ecotoxicológicos produzidos sobre eles são observados e avaliados (COSTA et al., 2008; PARANÁ, 2010).

Os efeitos ecotoxicológicos para amostras mais complexas, como os efluentes industriais, podem ser expressos pelo fator de toxicidade (FT), representando quantas vezes o corpo receptor precisaria diluir o efluente para que ele deixe de ser tóxico para os organismos presentes nos corpos d'água. Quanto mais alto for este valor, mais elevada será a ecotoxicidade da amostra (ARENZON et al., 2008; USEPA, 2002).

Efluentes de celulose Kraft têm sido avaliados empregando diferentes organismos como *Vibrio fischeri* e *Daphnia magna* para analisar a ecotoxicidade aguda do efluente (CHANDRA et al., 2011; GRÖTZNER et al., 2018). O tratamento destes efluentes por processos físico-químicos, biológicos ou avançados pode diminuir a toxicidade aguda como visto em Castro et al. (2019), Maria et al. (2014), Peitz e Xavier (2020) e Peitz et al. (2019).

Sendo internacionalmente reconhecida como organismo-teste, a *Daphnia magna* é utilizada em laboratórios ecotoxicológicos por apresentar curto tempo de vida e de reprodução, o que permite seu uso tanto para testes de toxicidade, além de mostrar expressiva sensibilidade em uma metodologia simples de ser aplicada (KNIE; LOPES, 2004). Seus descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura a menor variedade de respostas nos ensaios por sua estabilidade genética (KNIE; LOPES, 2004; USEPA, 2002).

No Brasil, nas resoluções 357/05 e 430/11 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) são definidos o enquadramento dos corpos hídricos brasileiros e os padrões para lançamento de efluentes. De acordo com estas resoluções, não deve ser constatado efeito de ecotoxicidade nos efluentes para os organismos aquáticos e ao corpo receptor (BRASIL, 2005a e 2011). Em âmbito estadual, tem-se no Paraná a resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente do Paraná (CEMA) nº 081/10, na qual são dispostos critérios e padrões de toxicidade para controle de efluentes lançados em corpos d'água (PARANÁ, 2010).

Para o lançamento de resíduos tratados de celulose e papel, deverão ser analisadas as características dos corpos hídricos receptores e também o FT dos efluentes. Para efluentes deste setor, o FT atualmente é de 2 em ensaios agudos e, pelas características apresentadas, o microcrustáceo *Daphnia magna* é o organismo indicado pela legislação para avaliação da ecotoxicidade dos efluentes destas indústrias (PARANÁ, 2010).

3.8. Legislação ambiental relativa à efluentes líquidos

Em âmbito nacional tem-se a resolução CONAMA n° 430, de 13 de maio de 2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Nesse sentido, a resolução CONAMA n° 430/11 define efluente como o termo usado para caracterizar os despejos líquidos provenientes de diversas atividades ou processos (BRASIL, 2011). Para tanto, não há uma legislação específica para o efluente de celulose, sendo a estes aplicados as normas gerais sobre efluentes.

Referente a legislação estadual do Paraná para efluentes, tem-se a resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA) n° 70, de 01 de outubro de 2009, que dispõe sobre o licenciamento ambiental, estabelece condições e critérios e dá outras providências para empreendimentos industriais. E, a resolução CEMA 81, de 19 de outubro de 2010, que dispõe sobre critérios e padrões de ecotoxicidade para o controle de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no estado (BRASIL, 2009; PARANÁ, 2010).

As condições de cada parâmetro adotado, como por exemplo: compostos fenólicos totais, cor, demanda bioquímica de oxigênio, demanda química de oxigênio, pH, temperatura e turbidez estão citadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Padrões de lançamento de efluente líquido

Parâmetros	Condições de lançamento	Resolução vigente
Cor (mg Pt L ⁻¹)	Valor de lançamento inferior a 75 mg Pt/L	CONAMA 430/11
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	Remoção mínima de 60% de DBO ₅ com valor inferior a 50 mg L ⁻¹	CEMA 070/09
DQO (mg L ⁻¹)	Valor de lançamento inferior a 300 mg L ⁻¹	CEMA 070/09
Ecotoxicidade (FT)	Máximo de FT=2 para efluente de celulose e papel	CEMA 081/10
pH	Entre 5 e 9	CONAMA 430/11
Temperatura (°C)	Inferior à 40 °C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C no limite da zona de mistura	CONAMA 430/11
Turbidez (UNT)	Limite de 100 UNT	CONAMA 430/11

Nota: CEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente do Paraná. CFT – compostos fenólicos totais. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio. FT – fator de toxicidade. SST – sólidos suspensos totais. UNT – unidade nefelométrica de turbidez.

Estes dados das resoluções vigentes contidos na Tabela 4 são utilizados para verificar a viabilidade de lançamento do efluente pós-tratamento por lagoa aerada facultativa assistido por bactérias (BRASIL, 2009 e 2011; PARANÁ, 2010).

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta, transporte e caracterização do efluente de celulose Kraft

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias (LATAR) do Departamento de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). O efluente industrial utilizado para tratamento contínuo no sistema de LAF foi gentilmente cedido por uma indústria de celulose Kraft não branqueada sediada na região metropolitana de Curitiba-PR, Brasil. As coletas foram feitas na entrada do sistema de tratamento, antes da decantação primária, a qual é seguida por tratamento biológico por lagoa aerada facultativa e por lagoa de maturação. As amostras foram transportadas para o laboratório em galões de 20 L e armazenadas a 4°C em ausência de luz (ABNT, 1987). Na Tabela 5 a seguir são apresentados os parâmetros com suas respectivas metodologias e frequência de realização das análises realizadas durante os 60 dias de operação da LAF da Fase I e da Fase II.

Tabela 5 - Caracterização físico-química do efluente e da biomassa

Parâmetros	Metodologia/Equipamento	Periodicidade
OD (mg L ⁻¹)	Oxímetro Lutron DO-5519	1 vez por semana
pH	pHmetro CienlaB mPA-210	Diária
ORP	pHmetro CienlaB mPA-210	1 vez por semana
Temperatura	NBR 9898 (ABNT, 1987)	1 vez por semana
Turbidez	Turbidímetro Policontrol AP2000	1 vez por semana
Análise microbiológica	(VICENTE et al., 2008)	1 vez por COV
COT (mg L ⁻¹)	Shimadzu VCPH 5310 B (APHA, 2017)	1 vez por COV
Ecotoxicidade aguda (FT)	NBR 12713 (ABNT, 2016)	1 vez por COV
MEEF	(CARSTEEN et al., 2016)	1 vez por COV
SST e SSV (mg L ⁻¹)	2540 D, E, F (APHA, 2017)	1 vez por COV
CA (UV _{254nm})	(ÇEÇEN, 2003)	3 vezes por semana
CFT (mg L ⁻¹)	(CHAMORRO et al., 2009)	3 vezes por semana
CL (UV _{280nm})	(ÇEÇEN, 2003)	3 vezes por semana
CLS (UV _{346nm})	(ÇEÇEN, 2003)	3 vezes por semana
Cor (Vis _{440nm})	(CHAMORRO et al., 2009)	3 vezes por semana
Cor (mg Pt L ⁻¹)	(HINOJOSA, 2014)	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)	3 vezes por semana

Nota: CA – compostos aromáticos. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. CLS – compostos lignossulfônicos. COT – carbono orgânico total. COV – carga orgânica volumétrica. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio. FT – fator de toxicidade. MEEF – matriz de excitação e emissão de fluorescência. OD – oxigênio dissolvido. ORP – potencial de oxirredução. SST – sólidos suspensos totais. SSV – sólidos suspensos voláteis.

A caracterização das amostras coletadas foi feita com amostras filtradas com filtro de nitrocelulose de porosidade 0,45 µm e analisadas por meio dos parâmetros de DBO₅, DQO, COT, cor (Vis_{440nm}), CFT, compostos aromáticos (UV_{254nm}) e compostos derivados de lignina, sendo CL (UV_{280nm}) e compostos lignossulfônicos (CLS) (UV_{346nm}) (APHA, 2017; ÇEÇEN, 2003; CHAMORRO et al., 2009).

A análise de cor foi inicialmente lida no comprimento de onda do visível de 440 nm pelo método de Chamorro et al. (2009) e posterior a estabilização da COV com o método de Hinojosa (2014) usando a Equação 1 (conforme curva analítica apresentada no Apêndice C), por correlação entre os valores obtidos em 440 nm para transformá-los em mg Pt L⁻¹, que é a unidade de medida de cor requerida nos critérios de lançamento.

$$Cor (mg Pt/L) = \frac{(abs Vis 440 nm - 0,1391)}{0,0043}$$

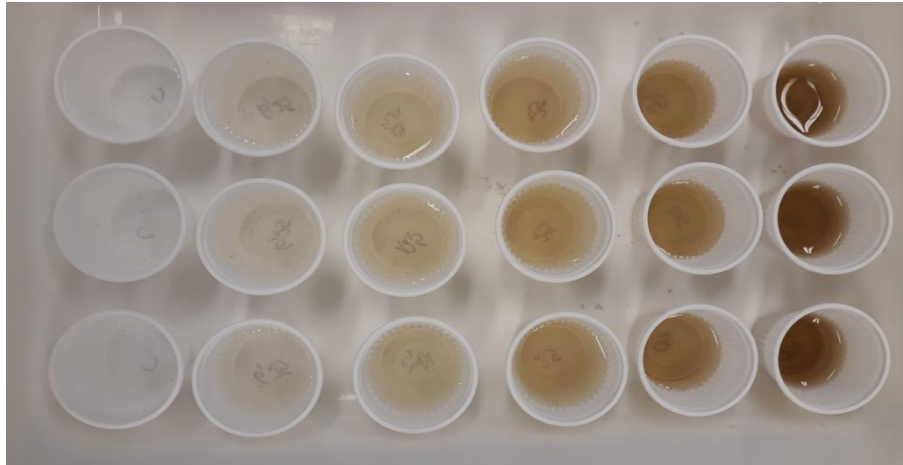
(Equação 1)

No fim de cada período fez-se análises de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV), para estimar o crescimento da biomassa e toxicidade do efluente. Além desses, foram controlados o pH e potencial de oxirredução (ORP) (pHmetro CienlaB mPA-210), oxigênio dissolvido (OD) (Oxímetro Lutron DO-5519), temperatura e turbidez (Turbidímetro Policontrol AP2000) semanalmente.

A análise de fluorescência por MEEF foi usada para identificar a presença de grupos fluorogênicos contidos nas amostras pré e pós-tratamento. O fenômeno da fluorescência implica na liberação de energia na forma de luz quando moléculas são excitadas com uma alta fonte de luz energética (LAKOWICZ, 2006; REYNOLDS, 2014). A MEEF possui várias vantagens, dentre elas que é rápida, barata, não usa reagentes, precisa de pouca preparação da amostra e é altamente sensível (CARSTEAN et al., 2016). A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) – UTFPR, Ecoville, em Espectrofotômetro de Fluorescência com um *scan* de comprimento de onda de Excitação de 200 nm a 700 nm, em cubeta de quartzo para analisar todos os picos possíveis dos componentes do efluente Kraft dando o resultado em Emissão no eixo x.

Os efeitos ecotoxicológicos agudos foram avaliados de acordo com a norma NBR 12713 de Ecotoxicologia Aquática com o microcrustáceo *Daphnia magna* (ABNT, 2016). Os organismos utilizados foram oriundos de cultivos mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia – UTFPR, sede Ecoville. Para estes ensaios foram utilizados filhotes (neonatos entre 2 e 26 horas de vida) de um mesmo lote, com as mesmas condições de cultivo e idade (KNIE; LOPEZ, 2004). Os filhotes foram submetidos ao gradiente de concentração do efluente testado e sem filtração prévia, seguindo 5 concentrações e o controle, como observado na Figura 5: 6,25%; 12,5%; 25%, 50% e 100%, utilizando-se água de diluição preparada de acordo com a ABNT (2016).

Figura 5 - Ensaio de ecotoxicidade com amostra de efluente Kraft



Fonte: Laboratório de Ecotoxicologia – UTFPR.

Cada concentração foi avaliada em triplicata e mantida nas mesmas condições de temperatura do cultivo realizado no laboratório, protegido da luz em incubadora a 20°C. Em cada bquer de 50 mL foram adicionados 20 neonatos em 40 mL das respectivas concentrações da amostra e do controle, contendo apenas água de diluição, sem alimentação. O efeito agudo foi estimado, baseando-se na CE50¹, em 48 horas de exposição, obtida e convertida para fator de toxicidade (FT) (ABNT, 2016).

O monitoramento e avaliação do desempenho das LAFs foi feito com base nas remoções de carga de DBO₅, DQO, cor, compostos aromáticos, compostos derivados de lignina e CFT. As remoções dos parâmetros físico-químicos foram calculadas com base na Equação 2.

$$\text{Remoção de carga (\%)} = \frac{(QA_{\text{fluente}} \times CA_{\text{fluente}} - QE_{\text{fluente}} \times CE_{\text{fluente}})}{QA_{\text{fluente}} \times CA_{\text{fluente}}} \times 100$$

(Equação 2)

Onde:

QA_{fluente} = Vazão do afluente (L d⁻¹)

QE_{fluente} = Vazão do efluente (L d⁻¹)

CA_{fluente} = Concentração ou valor do parâmetro analisado do afluente (mg L⁻¹ ou abs)

CE_{fluente} = Concentração ou valor do parâmetro analisado do efluente (mg L⁻¹ ou abs)

¹ CE50: Concentração efetiva do agente tóxico que causa efeito agudo, por exemplo, imobilidade ou morte, a 50% dos organismos-teste, num determinado período de exposição, nas condições de teste, por exemplo CE50; 48h (COSTA et al., 2008).

4.2. Sequência de atividades desenvolvidas

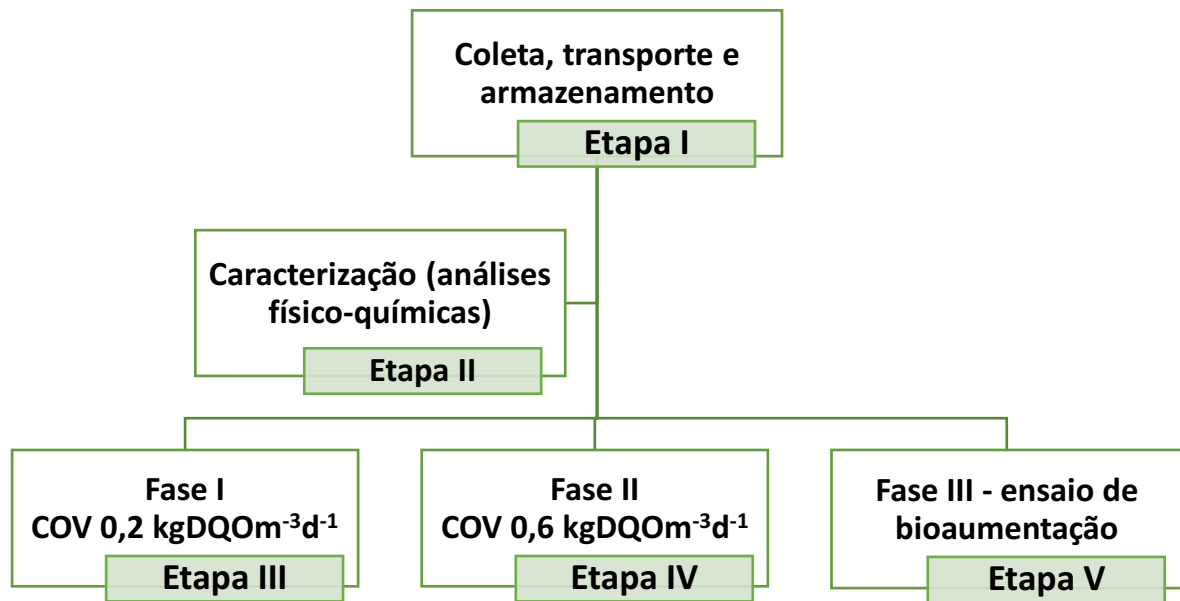
Após a caracterização do efluente de celulose Kraft foram montados os sistemas de tratamento com a LAF de bancada, em fluxo contínuo. A pesquisa foi dividida em cinco etapas, sendo elas: iniciando com a coleta, o transporte e o armazenamento do efluente bruto industrial; seguindo com a caracterização das amostras da indústria por meio de análises físico-químicas; na terceira, na quarta e na quinta etapas tem-se o tratamento do efluente industrial por lagoa aerada facultativa em escala de bancada com diferentes fases. Na Fase I realizou-se um tratamento com carga orgânica volumétrica (COV) de $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e na Fase II com COV de $0,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ em um período total de 60 dias em cada fase. Nas fases I e II fez-se análises físico-químicas de tratabilidade com a periodicidade apresentada na Tabela 5 para monitoramento da eficiência de remoção dos parâmetros e no fim do período de cada COV foram realizadas análises microbiológicas, de COT, SST e SSV, MEEF e ecotoxicidade.

Por fim, na Fase III foi desenvolvido um ensaio de bioaugmentação empregando algumas bactérias isoladas e identificadas do efluente, com potencial na remoção de compostos específicos. Os trabalhos de Bailón-Salas et al. (2017), Chandra et al. (2008), Duan et al. (2016), Hooda et al. (2018), Raj et al. (2014), Saleem et al. (2014), Singh et al. (2019) e Sonkar et al. (2019) forneceram subsídios para avaliar os microrganismos com maior eficiência na remoção de compostos específicos do efluente de celulose, baseados nos resultados de bioaugmentação obtidos pelos autores.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em conjunto com a mestrandia Izadora Cervelin Flôr do grupo de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, sob orientação da professora Vania Aparecida Vicente.

Na Figura 6 pode-se observar o fluxograma das atividades desenvolvidas na pesquisa.

Figura 6 - Fluxograma das atividades realizadas durante o tratamento por lagoa aerada facultativa



Fonte: Autoria própria (2021).

4.3. Sistema de tratamento por lagoa aerada facultativa

O tratamento biológico contínuo foi realizado em reator de LAF em escala de bancada, conforme o esquema da Figura 7, em material acrílico transparente, com 1 L de volume útil e com zona de sedimentação, a qual se aplicou a COV de 0,2 e 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹ nas Fases I e II respectivamente. A aeração foi promovida por bombas de ar com vazão de 35 L/h e o OD foi medido paralelamente a temperatura no interior do reator, na zona de aeração e na zona de sedimentação (ORDAZ-DÍAZ et al., 2016).

Figura 7 - Esquema da LAF de bancada



Fonte: Autoria própria (2021).

A adição de nutrientes ao afluente da LAF para DQO:N:P foi feita com 1,9103 g L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl) e 0,5624 g L⁻¹ de fosfato dipotássico (K₂HPO₄), a fim de se obter a proporção de 100:0,5:0,1, para a DQO:N:P (comunicação pessoal com os representantes da indústria). A alimentação da LAF deu-se por meio de bombas peristálticas (modelo Milan - Mod.BP 600). O pH do afluente foi corrigido para 7,00 (0,02) (pHmetro CienlaB mPA-210), com soluções de H₂SO₄ (0,01 e 1 mol L⁻¹) e NaOH (0,01 e 1 mol L⁻¹) antes da entrada na LAF.

As cargas previstas de 0,2 e 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹ foram mantidas por adequação da vazão do sistema de tratamento segundo a concentração de DQO do afluente da LAF e a vazão foi calculada conforme a Equação 3.

$$COV = \frac{Q \cdot S}{V} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

COV = Carga Orgânica Volumétrica pré-estabelecida (kg DQO m⁻³ d⁻¹)

Q = Vazão (m³ d⁻¹)

S = Concentração de substrato no afluente (kg DQO m⁻³)

V = Volume total do reator (m³)

Para a constituição de biomassa do sistema de LAF utilizou-se lodo proveniente do fundo da lagoa aerada da indústria que cedeu o efluente para estudo. A biomassa foi inoculada para uma concentração final de 70 mg SSV L⁻¹, valor este intermediário entre os usados em sistemas biológicos (VON SPERLING, 2014) e a concentração em lagoa aerada no tratamento de efluente Kraft de Peitz (2018).

4.4. Análise microbiológica

As análises microbiológicas para identificação dos grupos de bactérias presentes foram realizadas no Laboratório de Microbiologia – UFPR em conjunto com a mestrandia Izadora Cervelin Flôr do grupo de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, sob orientação da professora Vania Aparecida Vicente. As amostras isoladas e analisadas foram oriundas do período final de estabilização de cada COV da LAF. Na Figura 8 há um fluxograma das atividades realizadas para a identificação microbiológica.

Figura 8 - Análises realizadas na identificação das bactérias

Análise microbiológica

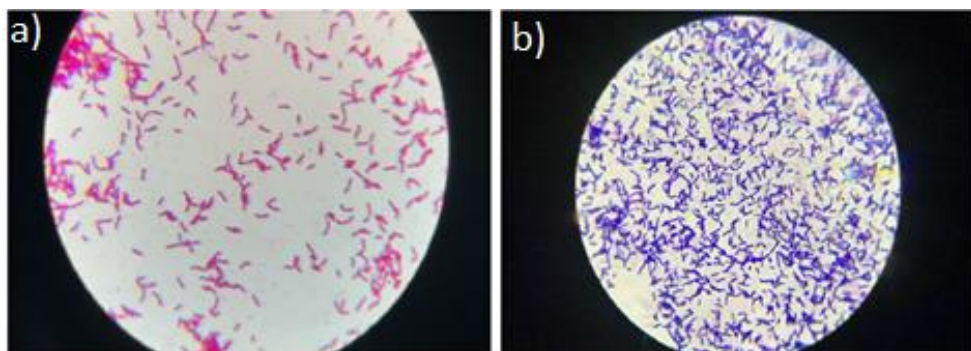
- Isolamento em meio de cultivo adequado
- Coloração de Gram
- Extração de DNA
- PCR
- Eletroforese em gel de agarose 1%
- Sequenciamento genético

Fonte: Autoria própria (2021).

Para a obtenção das culturas puras, foi empregada a técnica de isolamento das colônias crescidas no meio de cultura. O método baseia-se na semeadura dos microrganismos na superfície de meios de cultura sólidos em placas de Petri (DINIZ, 2018). Os meios de cultura adequados utilizados foram o ágar nutriente e o meio de Luria Bertani (LB). Após a semeadura incubou-se as placas em estufa a 37°C, onde permaneceram por 24 horas em ausência de luz e CO₂.

As 12 bactérias isoladas foram caracterizadas morfológicamente por meio das características das colônias das bactérias, classificando-as em Gram-negativas e Gram-positivas (STINGHEN et al., 2002). As lâminas da coloração de Gram foram analisadas em microscópio óptico em aumento de 400x para classificar as bactérias em Gram-negativas, quando vistas na cor rosa Figura 9 (a), e Gram-positivas quando vistas na cor violeta Figura 9 (b).

Figura 9 - Bacilos da coloração de Gram vistos em aumento de 400x



Nota: a) bacilos Gram negativos. b) bacilos Gram positivos.

Fonte: Laboratório de Microbiologia – UFPR.

A fim de analisar a diversidade microbiológica, inicialmente foi realizada a extração do DNA das bactérias por adaptação do método de Vicente et al. (2008) que consiste em três fases: lise das membranas, limpeza de contaminantes (proteínas e outras macromoléculas) e a precipitação do DNA.

O protocolo de extração de DNA teve início com a centrifugação de um tubo de Eppendorf, com volume de 2 mL, por 7 minutos a 12.000 rpm de 1 mL do cultivo das bactérias. Logo após, o tubo foi ressuscitado em 600 µL do tampão de extração STES (Tris HCl, EDTA e TE)². Depois a amostra foi homogeneizada em Vórtex por 2 minutos.

Em seguida, foram adicionados 120 µL de solução de dodecilsulfato de sódio pré-aquecida, um detergente iônico forte, cuja função é romper as membranas celulares. Após isso, adicionou-se a quantidade de 10 µL de proteinase K para hidrolisar as proteínas, e incubou-se por 60 minutos a 55°C em banho maria. Homogeneizou-se a amostra em Vórtex por 2 minutos.

Após a homogeneização, foi adicionado 120 µL de cloreto de sódio, para precipitar as proteínas por excesso de íons, e 85 µL de brometo de cetiltrimetilamônio 10%. Novamente incubou-se a amostra por 60 minutos a 55°C em banho maria. Após isto, adicionou-se 500 µL de CIA, que é uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico na razão 24:1, que serve para lavar a amostra deixando o DNA mais purificado. Depois, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 9.500 rpm. Após a centrifugação, transferiu-se a fase aquosa para um tubo novo adicionando mais 500 µL de CIA, nova centrifugação e transferência para um tubo novo.

Depois adicionou-se 225 µL de álcool 96% e a amostra foi incubada no freezer por uma noite para maior concentração de DNA. No outro dia, o incubado foi centrifugado por 7 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O tubo foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado por 7 minutos a 12.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Assim, as amostras foram colocadas em estufa para a secagem e por último, o DNA foi ressuscitado em 100 µL de água ultrapura Milli-Q autoclavada.

Para avaliar a qualidade da extração 1 µL das amostras foram inseridas em um Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 para medir a concentração de ácido nucleico nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, em que uma razão entre 260/280 nm de 1 a 2 indica extração de DNA eficiente.

² “Tris HCl (pH 8,0) é uma solução tampão, cuja finalidade é manter o pH constante. Como o pH ótimo para a ação de DNases endógenas é por volta de 7,0, este reagente ajuda a evitar a ação destas nucleases. O EDTA age quelando íons Mg^{2+} e Ca^{2+} (que são co-fatores de diversas enzimas nucleares como as DNases). E o TE é um tampão que impede também a variação do pH” (GOUVEIA; REGITANO, 2007, p. 6).

Após isto fez-se à amplificação do gene 16S rDNA por meio da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) que consistiu em 2 µL de DNA; 0,6 µL de *primer* 968F e 0,6 µL de *primer* 1392R; 1,3 µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), que são as bases nitrogenadas adenina/timina, guanina, citosina e uracila; 1,3 µL de buffer, que são tampões de Tris HCl 200 mM (pH 8,4) e KCl 500 mM responsáveis pelo recozimento dos *primers*; 0,2 µL de Taq DNA polimerase; 0,4 µL de Mg⁺² que é essencial para o funcionamento da enzima e é um agente estabilizador; e 6,1 µL de água.

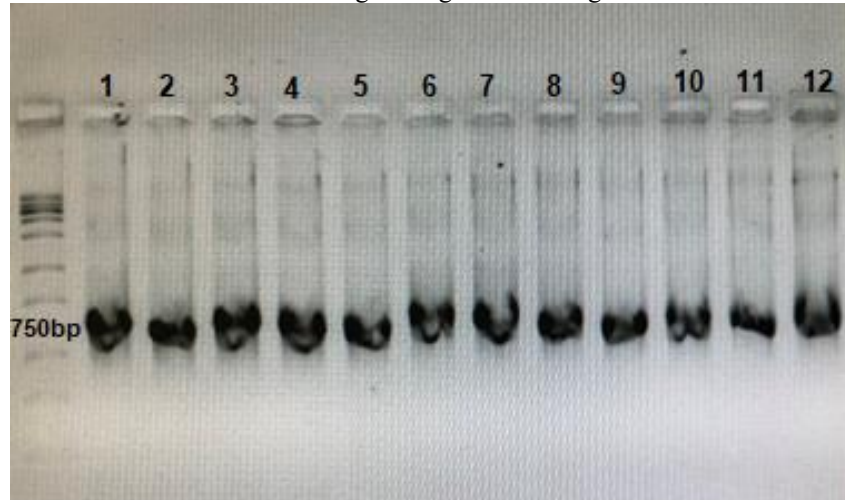
Após a preparação da reação, a amplificação foi realizada em termociclador, em que se teve 35 ciclos com temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 30 segundos para abrir a fita de DNA; depois um anelamento a 55°C por 30 segundos, para os *primers* se ligarem a fita de DNA e extensão a 72°C por 90 segundos, em que a Taq DNA polimerase iniciou a síntese da nova fita, produzindo milhões de cópias da fita molde. Após os 35 ciclos, foi feita uma extensão final a 72°C por 10 minutos e depois o resfriamento até 4°C.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (SILVA, 2015). A técnica possibilita a separação das fitas de DNA da PCR de acordo com suas sequências de pares de bases, por meio dos elétrons contidos nas fitas. Assim, cada banda que é visível no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria.

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de agarose preparado a partir de 1,6 g de agarose, 100 mL de tampão TBE 1X (ácido bórico 100 mM, Tris-borato 45 mM e EDTA 10 mM em pH 8,0) e aquecidos em forno micro-ondas de 30 em 30 segundos até ficar translúcido. Após a preparação do gel, 30 mL foi despejado em cada cuba; colocou-se o suporte contendo os pentes próprios que serviram como molde para produzir os poços no gel; após este passo, aguardou-se 10 minutos para polimerização da matriz da agarose e retirou-se os pentes; por fim, adicionou-se 2 µL de produto de PCR no gel (DNA extraído), 2 µL de corante *Safer* para analisar a corrida de elétrons na eletroforese por meio da cor, substituindo o uso de brometo de etídio que é considerada uma solução possivelmente cancerígena e mutagênica se exposto (SILVA, 2015).

Após estes passos, o gel de agarose 1% foi colocado no interior da cuba de eletroforese em 108 V por cerca de 1 hora para os elétrons percorrem um caminho, os quais fazem as separações das fitas de DNA 16S posteriormente analisadas. As bandas geradas são avaliadas no PhotoDoc-It™ Imaging System, como representadas na Figura 10.

Figura 10 – Resultados da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 16S rDNA dos isolados



Fonte: Laboratório de Microbiologia – UFPR.

Por fim, os fragmentos de DNA correspondentes ao 16s DNA foram purificados e sequenciados no Setor de Ciências Biológicas, no Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Bioquímica – UFPR, cuja sequência foi analisada na base do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para se obter uma similaridade estatística com NCBI-BLAST. O resultado obtido da similaridade estatística acima de 97% infere que se trata da mesma espécie de bactéria identificada (YARZA et al., 2014).

Os alinhamentos das bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento genético foram feitos no *software* MEGA por meio do método de *Bootstrap* para dar maior confiabilidade no resultado de acordo com a evolução genética que as espécies possuem, vistos em uma árvore filogenética. Quando a quantidade de réplicas for de 100 vezes, a espécie cuja réplica ficar mais próxima de 100 é a identificada na amostra, vindo de um ancestral em comum (HALL, 2013).

4.5. Ensaio de bioaugmentação

O ensaio de bioaugmentação, identificado como Fase III, teve como referência o trabalho de Saleem et al. (2014). As bactérias foram escolhidas por terem aparente adaptabilidade ao efluente Kraft, pela sua abundância no meio de cultivo utilizado para o isolamento e também pelo potencial de biorremediação desses isolados em estudos de bioaugmentação.

Inicialmente fez-se o plaqueamento de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus glucanolyticus* seguido de incubação em estufa a 28°C por 24 horas. Após este

período pegou-se um raspado de cada placa e cada uma foi colocada em um frasco estéril contendo 3 mL de meio *Nutrient Broth* (NB) seguido por incubação por 24 horas em estufa a 28°C.

Após as 24 horas foi realizada a estimativa da concentração de bactéria inoculada por absorbância em espectrofotômetro (600 nm). Do frasco estéril foi retirado 2 mL de solução com bactéria e inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio nutriente NB. Assim, as três espécies foram colocadas em um agitador tipo Shaker a 30°C com 70 rpm de rotação.

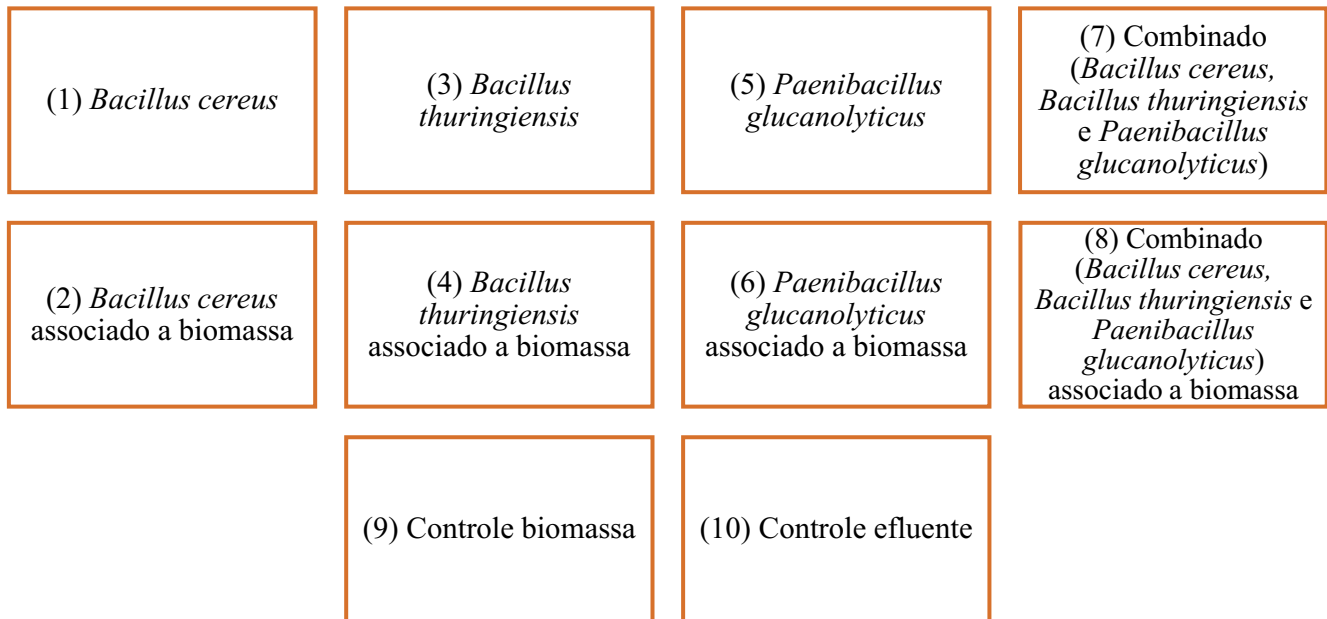
Para avaliar a quantidade de bactéria a ser inoculada, a cada 1 hora fez-se a análise da concentração de bactérias por mL pela avaliação por densidade óptica das amostras em espectrofotômetro de UV-Vis com comprimento de onda de 600 nm para avaliar se a absorbância estava entre 0,6-1,0, a qual corresponde a concentração entre $5,0-8,0 \times 10^8$ células mL⁻¹ (BOMBARDI, 2018).

Com os resultados da absorbância, fez-se a análise pelo *software* Chem Agilent³ para avaliar a quantidade de bactérias em termos de Unidade Formadora de Colônia em 1 mL (UFC mL⁻¹). Avaliada a quantidade em UFC mL⁻¹ foi inserido em cada ensaio 1 mL da bactéria para tratamento.

Na Figura 11 há um fluxograma da esquematização dos ensaios para o tratamento por bioaugmentação da Fase III.

³ Site do *software*: <https://www.chem.agilent.com/store/biocalculators/calcODBacterial.jsp>

Figura 11 - Esquematização dos ensaios de bioaumentação



Fonte: Autoria própria (2021).

Ao todo foram 10 tipos de ensaios distintos colocados em agitador orbital do tipo Shaker a 25°C com agitação de 70 rpm e um TDH de 2,1 d, para promover a COV de 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹ como na LAF, e a aeração foi promovida por bomba de ar. Na Figura 12 há imagens dos reatores em agitador orbital do tipo Shaker para o tratamento de efluente Kraft por bioaumentação.

Figura 12 - Ensaio de bioaumentação



Nota: a) ensaios de bioaumentação. b) agitador orbital do tipo Shaker.

Fonte: Autoria própria (2021).

Na Tabela 6 há uma relação do total de ensaios desenvolvidos na bioaumentação com as espécies de bactérias identificadas.

Tabela 6 - Total de ensaios de bioaumentação

Ensaio	Quantidade de ensaios ¹
<i>Bacillus cereus</i>	Triplicata
<i>Bacillus cereus</i> associado a biomassa	Triplicata
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Triplicata
<i>Bacillus thuringiensis</i> associado a biomassa	Triplicata
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	Triplicata
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> associado a biomassa	Triplicata
Combinado (<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>)	Triplicata
Combinado (<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>) associado a biomassa	Duplicata
Controle efluente	Sem réplica
Controle biomassa	Sem réplica
Total	25

Nota - ¹ – o coeficiente de variação adotado para as réplicas foi de C.V. < 5,0%.

Ao total foram 25 ensaios de bioaumentação com COV de 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹, em que cada Erlenmeyer continha 100 mL de efluente, 70 mg SSV L⁻¹ de biomassa, quando aplicável, 1 mL da bactéria isolada e razão de nutriente de 100:0,5:0,1 em pH 7,0.

A eficiência do tratamento foi avaliada em função de DBO₅, DQO, CFT, cor e compostos derivados de lignina, sendo compostos lignínicos, aromáticos e lignossulfônicos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Coleta e caracterização do efluente bruto de celulose Kraft

A caracterização do efluente de celulose foi realizada logo após a coleta de amostra na indústria de celulose que cedeu o efluente bruto para o estudo. Para tanto foram caracterizadas DBO₅, DQO, COT, cor, compostos lignínicos e seus derivados, compostos fenólicos totais e pH do efluente, conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização do efluente da indústria de celulose

Parâmetros	Fase I	Fase II	Fase III
pH	7,50 (0,30)	7,52 (0,50)	7,32 (0,10)
DQO (mg L ⁻¹)	440,89 (10,80)	650,00 (5,20)	360,00 (18,0)
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	124,74 (8,70)	252,20 (9,20)	120,40 (2,1)
DBO ₅ /DQO	0,28	0,39	0,33
CFT (mg L ⁻¹)	174,82 (34,00)	347,46 (3,83)	295,11 (3,24)
Cor (Vis _{440nm})	0,31 (0,10)	0,45 (0,01)	0,28 (0,01)
CA (UV _{254nm})	2,65 (0,24)	6,90 (0,12)	2,83 (0,01)
CL (UV _{280nm})	2,85 (0,30)	6,49 (0,28)	2,50 (0,49)
CLS (UV _{346nm})	1,05 (0,25)	1,82 (0,15)	0,78 (0,09)

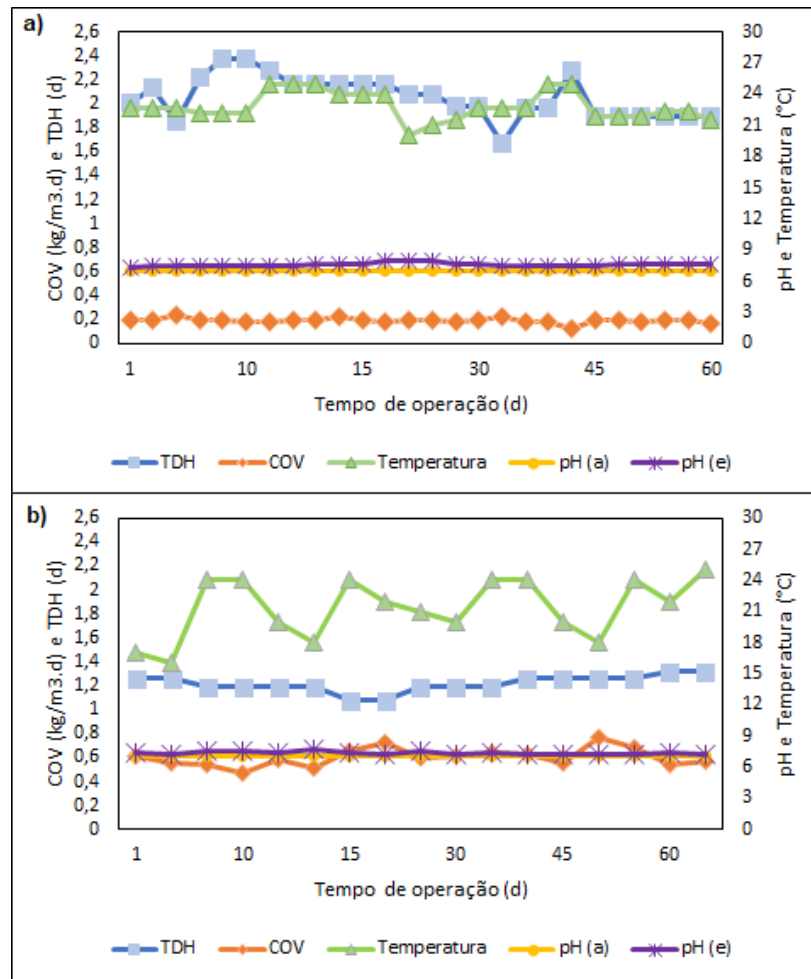
Nota: Os valores apresentados na tabela são as médias dos resultados obtidos a partir das análises de caracterização do afluente utilizado durante o tratamento. Entre parênteses estão os desvios padrão desses resultados. CA – compostos aromáticos. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. CLS – compostos lignossulfônicos. COT – carbono orgânico total. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio.

Na Fase I foi utilizado uma amostra cujo afluente apresentou uma razão de DBO₅/DQO de 0,28. Na Fase II o afluente teve uma razão de 0,39 e na Fase III a razão de matéria orgânica se encontrou em 0,33. De acordo com Jordão e Pessoa (2016) valores acima de 0,30 sugerem uma boa biodegradabilidade, sendo favoráveis para tratamento biológico.

5.2. Operação da lagoa aerada facultativa de bancada

Na Figura 13 (a) e (b) encontram-se dados dos parâmetros de controle da LAF em relação a carga orgânica volumétrica, pH, temperatura e tempo de detenção hidráulica.

Figura 13 - Parâmetros de controle da LAF



Nota: a) COV 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹. b) COV 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹. COV – carga orgânica volumétrica. pH (a) – pH do afluente. pH (e) – pH do efluente. TDH – tempo de detenção hidráulica.

A carga orgânica média da Fase I foi de 0,19 (0,02) kg DQO m⁻³ d⁻¹, próximo ao valor previsto, e da Fase II foi de 0,60 (0,07) kg DQO m⁻³ d⁻¹. Estas COV resultaram num valor de TDH médio de 2,1 d para a Fase I e de 1,2 d para a Fase II. A temperatura média da Fase I foi de 22,7°C, sendo a mínima de 20,1°C e a máxima de 25,0°C, e para a Fase II a temperatura média foi de 21,3°C, sendo a mínima de 16,0°C e a máxima de 25,0°C. Essa variância na temperatura da Fase II pode interferir no desempenho do sistema, visto que temperaturas mais estáveis são melhores para o desenvolvimento dos microrganismos (METCALF; EDDY, 2016).

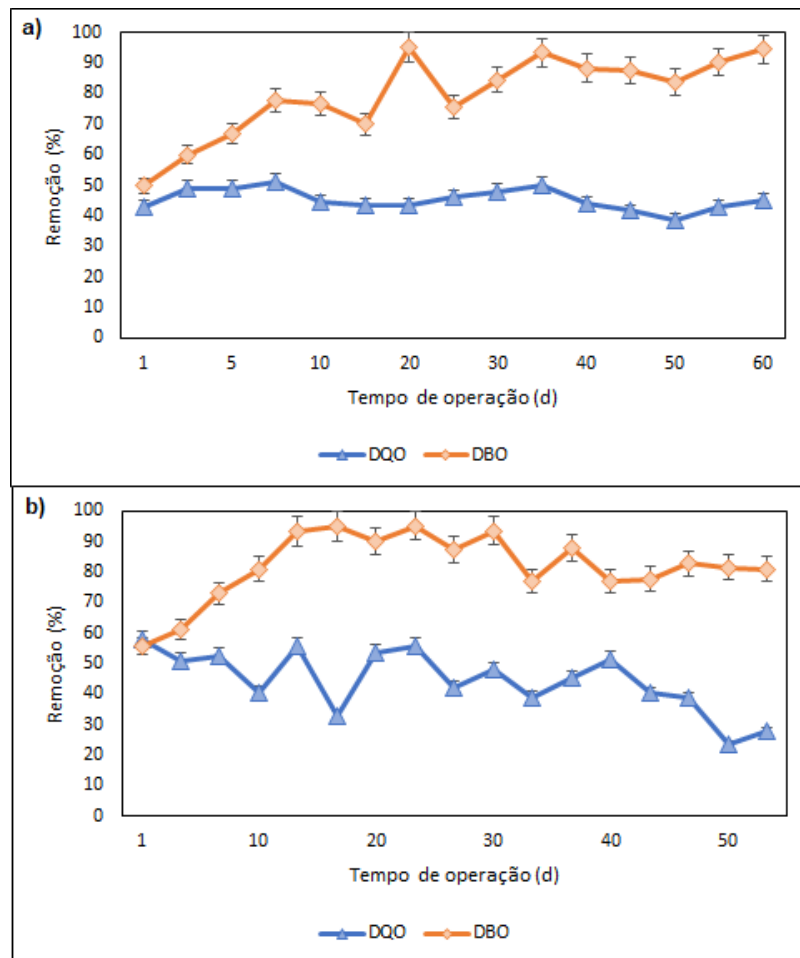
O pH do afluente foi regulado a 7,0 para entrar no sistema de tratamento por LAF em ambas as fases, mas a média de pH no efluente tratado da Fase I foi de 7,50 e para a Fase II foi de 7,52. A média do oxigênio dissolvido na zona de aeração foi de 6,3 (0,39) mg L⁻¹ e na zona

de sedimentação foi de 3,9 (0,83) mg L⁻¹ totalizando uma média de 5,1 mg L⁻¹ para a Fase I. Na Fase II a média do oxigênio dissolvido na zona de aeração foi de 3,5 (0,42) mg L⁻¹ e na zona de sedimentação foi de 1,5 (0,26) mg L⁻¹ totalizando uma média entre os dois valores de 2,5 mg L⁻¹. O ORP (potencial de oxirredução) medido na zona aerada da Fase I foi de 52,0 (2,80) mV e na zona de sedimentação foi de -23,5 (3,50) mV, na Fase II foi de 42,0 (3,50) na zona aerada e na zona de sedimentação foi de -31,0 (2,40) mV. O que está de acordo com o sistema de LAF, onde se observa um ambiente anóxico na zona de sedimentação. Assim, de acordo com Metcalf e Eddy (2016) um ambiente aeróbio proporciona um ORP > 100 mV.

5.3. Avaliação da remoção da matéria orgânica da LAF

A Figura 14 (a) e (b) apresenta os dados de remoção de matéria orgânica em termos de DBO₅ e DQO.

Figura 14 - Remoção de matéria orgânica em relação a DBO₅ e DQO



Nota: a) COV 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹. b) COV 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio.

Na Figura 14 (a) e (b) observa-se que os valores da média de remoção de DBO_5 foram superiores a 90% tanto na Fase I quanto na Fase II, com um máximo de remoção de 94% nos dois sistemas, indo de encontro a literatura em que sistemas de lagoas aeradas podem variar entre 50-95% na remoção de DBO_5 em efluente de indústrias papel e celulose (MACHADO et al., 2018; PEITZ; XAVIER, 2020). Na Figura 14 (a) o pico de remoção de DBO_5 no tempo de operação de 20 dias está relacionado a falha na operação do sistema de tratamento.

Em relação a DQO observa-se que para as duas cargas houve remoção variando entre 40-60% durante os 60 dias de operação. Na Fase I houve maior estabilidade na remoção deste parâmetro do que na Fase II. De modo geral, o nível de remoção foi similar ao obtido por Machado et al. (2018) utilizando a carga orgânica de $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ em lagoa aerada. Hubbe et al. (2016) e Kamali et al. (2019) mencionaram a dificuldade que os sistemas biológicos possuem para tratar o efluente de celulose devido a presença de compostos recalcitrantes.

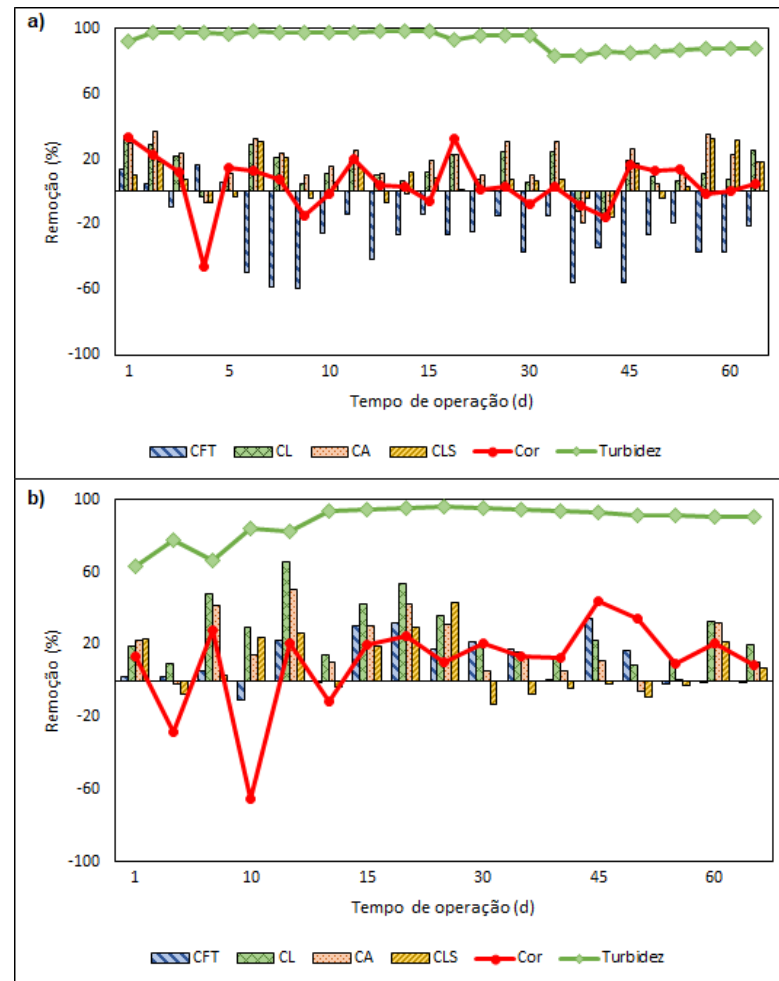
A análise da remoção de COT teve como média 49% para a LAF com COV de $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e uma média de 41% de remoção para a Fase II. Os resultados obtidos nestas cargas foram semelhantes ao resultado obtido por Lewis et al. (2018) em lagoa aerada facultativa.

No estado do Paraná - Brasil, o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA), estabelece que para indústrias de celulose e papel o limite de DBO_5 no efluente descarregado em corpos hídricos é de 50 mg L^{-1} e o de DQO é de 300 mg L^{-1} (PARANÁ, 2010). Assim, o tratamento realizado foi eficaz para adequação do efluente aos critérios de lançamento baseados na matéria orgânica global.

5.4. Avaliação dos compostos específicos, cor e turbidez da LAF

A Figura 15 traz representados os dados da remoção de compostos específicos, sendo eles: compostos fenólicos totais, compostos lignínicos, compostos aromáticos, compostos lignossulfônicos, além dos parâmetros de cor e turbidez.

Figura 15 - Avaliação de remoção dos compostos específicos, cor e turbidez



Nota: a) COV 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹. b) COV 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹. CA – compostos aromáticos. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. CLS – compostos lignossulfônicos.

É possível observar na Figura 15 (a) que os CFT tiveram incremento durante o tratamento por LAF com média de 26%, e na Figura 15 (b) houve remoção de CFT em torno de 11%. Alguns estudos com efluente Kraft apresentaram incremento de compostos fenólicos totais em sistemas biológicos aerados (CHAMORRO et al., 2009; DUARTE et al., 2018; MACHADO et al., 2018; MELCHORS, 2019; PEITZ; XAVIER, 2019). Contudo, na Fase II a aeração do sistema foi menor, favorecendo a remoção destes compostos pela LAF.

Em relação aos demais compostos específicos do efluente de celulose Kraft observou-se que a remoção de compostos lignínicos ficou em torno de 13% na Fase I e na Fase II a média foi de 27%. Para os compostos aromáticos a média de remoção foi de 16% na Fase I e na Fase II foi de 18%. Os compostos lignossulfônicos tiveram remoção média de 8% tanto na Fase I quanto na Fase II.

Os eventuais incrementos de compostos específicos derivados de lignina em lagoa aeradas também foram observados por Machado et al. (2018) e Peitz e Xavier (2019), e foram relacionados com processos de biotransformação de moléculas de alto peso molecular durante o tratamento biológico nesses sistemas.

Segundo mostrado na Figura 15 (a) e (b) é possível analisar que não houve remoção expressiva de cor, alcançando 4% para a Fase I e 10% para a Fase II. O incremento observado nos primeiros 10 dias de operação tem sido relacionado a problemas de instabilidade na partida dos sistemas de LAFs. Segundo Lewis et al. (2018) e Peitz e Xavier (2019) o incremento de cor pode estar relacionado ao processo de biotransformação de unidades cromóforas e a condensação dos compostos formadores de cor sem que o efluente seja mineralizado. Em outras pesquisas também foi verificada baixa remoção de cor durante o tratamento por lagoa aerada (KAMALI; KHODAPARAST, 2015; PEITZ; XAVIER, 2019).

Em relação a remoção de turbidez na Fase I o sistema apresentou uma remoção média de 94% e na Fase II a média foi de 87%. De maneira geral, o sistema de LAF, em ambas as fases, apresentou boa remoção nesse parâmetro, indicando potencial para a clarificação do efluente na zona de sedimentação da LAF.

5.5. Razão de C:N:P e a performance de lagoas aeradas

Na Tabela 8 são apresentados os desempenhos comparativos destes estudos com outros dois estudos realizados no mesmo sistema de lagoa aerada facultativa tratando efluente de celulose Kraft, e a relação de C:N:P empregada.

Tabela 8 - Comparação de parâmetros entre lagoas aeradas facultativas

Parâmetros	Remoção (%)			
	100:0,5:0,1 ¹	100:0,5:0,1 ²	100:5:1 ³	100:5:1 ⁴
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	94	80	87	75
DQO (mg L ⁻¹)	51	44	52	50
COT (mg L ⁻¹)	49	41	-	-
CFT (mg L ⁻¹)	-26	11	24	-20
Cor (Vi _{S440nm})	4	10	7	12
CL (UV _{280nm})	13	27	18	16
Turbidez (UNT)	94	87	97	-
	Valores			
OD (mg L ⁻¹)	3,9	2,5	6,3	4,0

Nota: ¹ nesse trabalho Fase I, ² nesse trabalho Fase II, ³ Machado et al. (2018), ⁴ Peitz e Xavier (2019). Os valores apresentados na tabela são as médias dos resultados obtidos a partir das análises durante o tratamento. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. COT – carbono orgânico total. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio. UNT – unidade de turbidez. OD – Oxigênio dissolvido. Valores negativos indicam incremento no parâmetro.

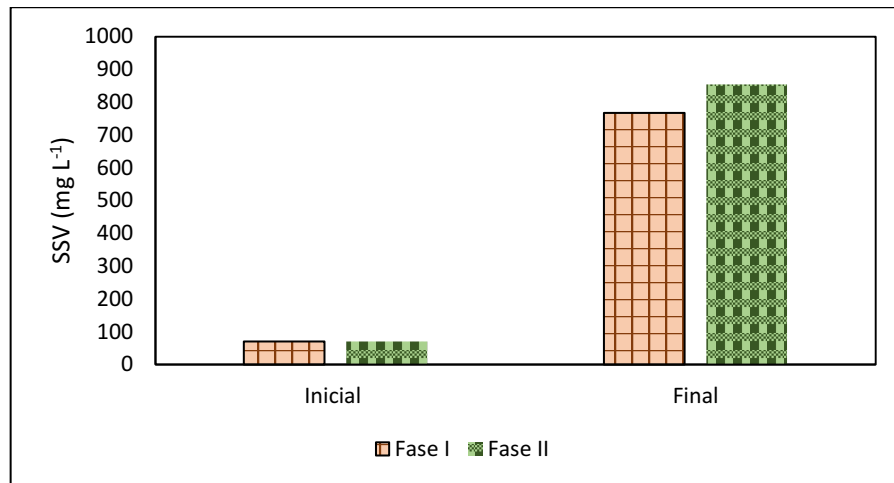
Nos trabalhos de Machado et al. (2018) e Peitz e Xavier (2019) a relação de nutrientes foi de 100:5:1 e neste estudo foi de 100:0,5:0,1, o que se assemelha mais à demanda de uma LAF e ao empregado na prática pela indústria.

Comparando os trabalhos é possível ver que a remoção de matéria orgânica biodegradável (DBO₅) foi melhor nesse trabalho com COV 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹ do que naqueles com maior uso de nutrientes, bem como de outros parâmetros que tiveram remoção superior ou igual à razão de 100:5:1. A menor remoção de cor, no entanto pode estar associada ao baixo potencial redox na zona de sedimentação da LAF. E para o parâmetro de CFT a baixa eficiência na remoção pode estar relacionada a aeração do sistema e também ao fato de que no trabalho de Machado et al. (2018) os autores utilizaram uma enzima capaz de remover compostos fenólicos totais. Se observou que a demanda de nutrientes pode ser otimizada o que pode gerar uma economia no processo de tratamento.

5.6. Análise da biomassa

Na Figura 16 está representado no gráfico o crescimento da biomassa na Fase I e II em termos de sólidos suspensos voláteis.

Figura 16 - Crescimento da biomassa nas LAFs



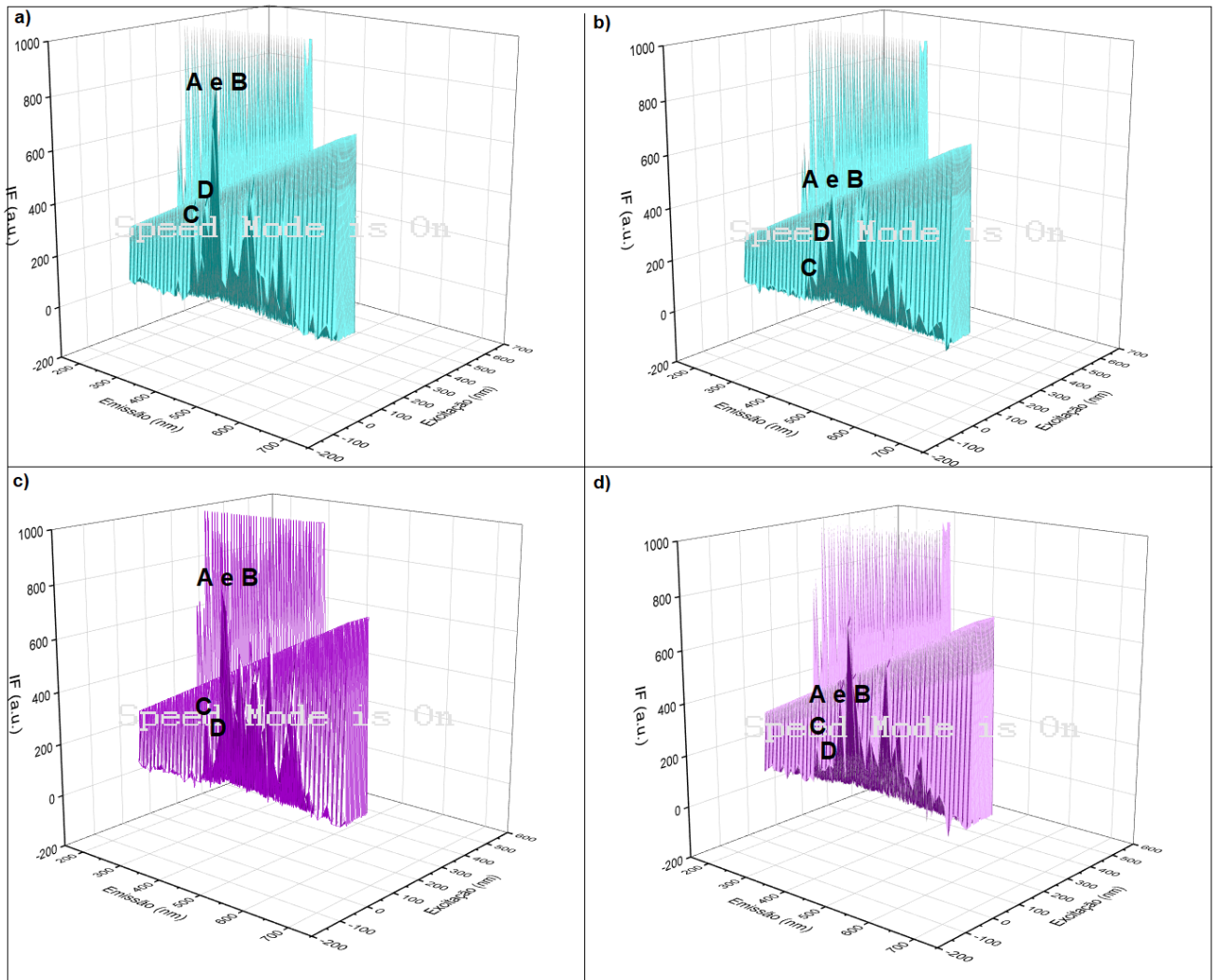
Nota: Fase I – COV 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Fase II – COV 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹. SSV – sólidos suspensos voláteis.

Na Figura 16 é possível observar que o lodo (biomassa) após 60 dias de operação da lagoa na Fase I alcançou 770 mg L⁻¹ em termos de SSV e os SST foram de 1181 mg L⁻¹. A razão SSV/SST média foi de 0,67 e indica uma biomassa estabilizada (VON SPERLING, 2014). Na Fase II o SSV alcançou 854 mg L⁻¹ e os SST foram de 1238 mg L⁻¹. A razão SSV/SST média foi de 0,62 na Fase II. Essa taxa de crescimento observada foi de 1100% e é comparável à observada por Peitz (2018) onde a biomassa cresceu de 70 mg L⁻¹ de SSV para 1783 mg L⁻¹ para 60 dias de operação em lagoa aerada contendo meio suporte com COV similar à desse trabalho.

5.7. Análise de matriz de excitação e emissão de fluorescência (MEEF)

Na Figura 17 estão apresentadas as matrizes de excitação e emissão de fluorescência (MEEF) dos sistemas de tratamento. A intensidade de fluorescência (IF) é expressa em unidades arbitrárias (a.u. do inglês *arbitrary units*).

Figura 17 - Matriz de excitação e emissão de fluorescência do afluente e efluente da lagoa



Nota: a) MEEF do afluente da Fase I. b) MEEF do efluente da Fase I. c) MEEF do afluente da Fase II. d) MEEF do efluente da Fase II.

Fonte: Autoria própria (2021).

Na Figura 17 (a), (b), (c) e (d) são observados diferentes picos de fluorescência, representados pelos comprimentos de onda de excitação (λ_{EX}) e emissão (λ_{EM}). Os picos observados foram denominados A, B, C e D.

Os picos A e B, situados na região de $\lambda_{EM} < 380$ nm são indicados por Carstea et al. (2016) em diversas MEEF obtidas em águas residuárias. Esses picos são associados a metabólitos de atividade microbológica (BRIDGEMAN et al., 2013).

O pico C é relacionado às características químicas comuns de efluentes de indústrias de celulose, como compostos derivados de lignina (MANAGÓ, 2019). Nesse sentido, Baker (2002) apresenta o pico λ_{EX} 290 nm/ λ_{EM} 340 nm como resultante da lignina e dos açúcares produzidos pelo processo de polpação, que possivelmente são ricos em proteínas aromáticas.

O pico D está relacionado com ácidos lignossulfônicos, produzidos pela degradação da lignina (MELCHIORS, 2019). Sendo assim, comparando-se as Figuras 17 (a) e (b) e Figuras 17 (c) e (d) é possível observar uma pequena remoção desses compostos.

Na Figura 17 (a), (b), (c) e (d) são apresentados os espectros em 3D da diferença entre a intensidade de fluorescência emitida no afluente e no efluente das LAFs. É possível analisar por meio da intensidade dos picos entre afluente e efluente que a remoção de metabólitos e produtos de biotransformação (picos A e B) parece ter sido mais eficiente comparando-se as Figuras 17 (a) e (b); enquanto a remoção de compostos específicos do efluente Kraft foi mais eficiente na Fase II, relacionada a Figura 17 (c) e (d), do que da Fase I, relacionada a Figura 17 (a) e (b).

Esses resultados de MEEF corroboram com os obtidos em diferentes cargas orgânicas volumétricas que também se depararam com a remoção de compostos fluorogênicos no efluente de celulose (CARSTEAD et al., 2016; JANHOM et al., 2011; MELCHIORS, 2019; MURPHY et al., 2011).

5.8. Análise de ecotoxicidade

Os resultados de ecotoxicidade aguda foram feitos com *Daphnia magna* com exposição de 48 horas no afluente e no efluente tratado por LAF. O fator de toxicidade obtido nos afluentes e efluentes de ambas as fases foi de 1 ($FT = 1$), o qual mostra que a amostra de efluente obtido da indústria de celulose e papel não apresentou toxicidade aguda mesmo na concentração de 100%. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Machado et al. (2018) e Peitz e Xavier (2019) com *Daphnia magna* exposta ao mesmo tipo de efluente. Assim, estes dados atendem a legislação estadual vigente da resolução CEMA n° 081/10 (PARANÁ, 2010).

5.9. Análise dos critérios de lançamento

Na Tabela 9 estão apresentados os valores obtidos pós-tratamento nas duas cargas orgânicas do sistema de tratamento por LAF para verificar se segue as condições de lançamento de acordo com os critérios exigidos pelo CONAMA 430/11, em âmbito nacional e pelo CEMA 070/09 e 081/10, em âmbito estadual.

Tabela 9 - Critérios de lançamento do efluente

Parâmetros	Condições de lançamento	Fase I	Fase II
Cor (mg Pt L ⁻¹)	Valor inferior a 75	39,75	125,80
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	Valor inferior a 50	29,10	47,33
DQO (mg L ⁻¹)	Valor inferior a 300	211,74	399,47
Ecotoxicidade (FT)	Máximo de FT=2 para efluente de celulose e papel	FT = 1	FT = 1
pH	Entre 5 e 9	7,40	7,42
Temperatura (°C)	Inferior à 40 °C	22,71	20,70
Turbidez (UNT)	Limite de 100	5,06	22,10

Nota: DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio. FT – fator de toxicidade. UNT – unidades nefelométricas de turbidez.

É possível observar na Tabela 9 que o efluente tratado atende as condições de lançamento para os parâmetros de cor para a Fase I, DBO₅ ambas as fases, DQO para a Fase I, ecotoxicidade, pH, temperatura e de turbidez para ambas as fases (BRASIL, 2009 e 2011; PARANÁ, 2010).

Para o parâmetro de cor na Fase II é possível analisar que o efluente após o tratamento obteve um valor acima do critério de lançamento, porque, apesar do sistema com carga de 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹ ter maior remoção no parâmetro de cor, o efluente industrial bruto continha maior quantidade de compostos recalcitrantes, comparado ao efluente bruto da Fase I.

Em relação ao parâmetro de DQO da Fase II o efluente industrial bruto estava com uma demanda química de oxigênio elevada e apesar da eficiência do tratamento por LAF ter a remoção de 44% para este parâmetro, o efluente tratado ficou acima de 300 mg L⁻¹, o que estaria fora dos critérios de lançamento.

5.10. Identificação das bactérias contidas no efluente

Na Tabela 10 está representado as bactérias identificadas no efluente de celulose Kraft.

Tabela 10 - Bactérias cultiváveis identificadas nas LAFs

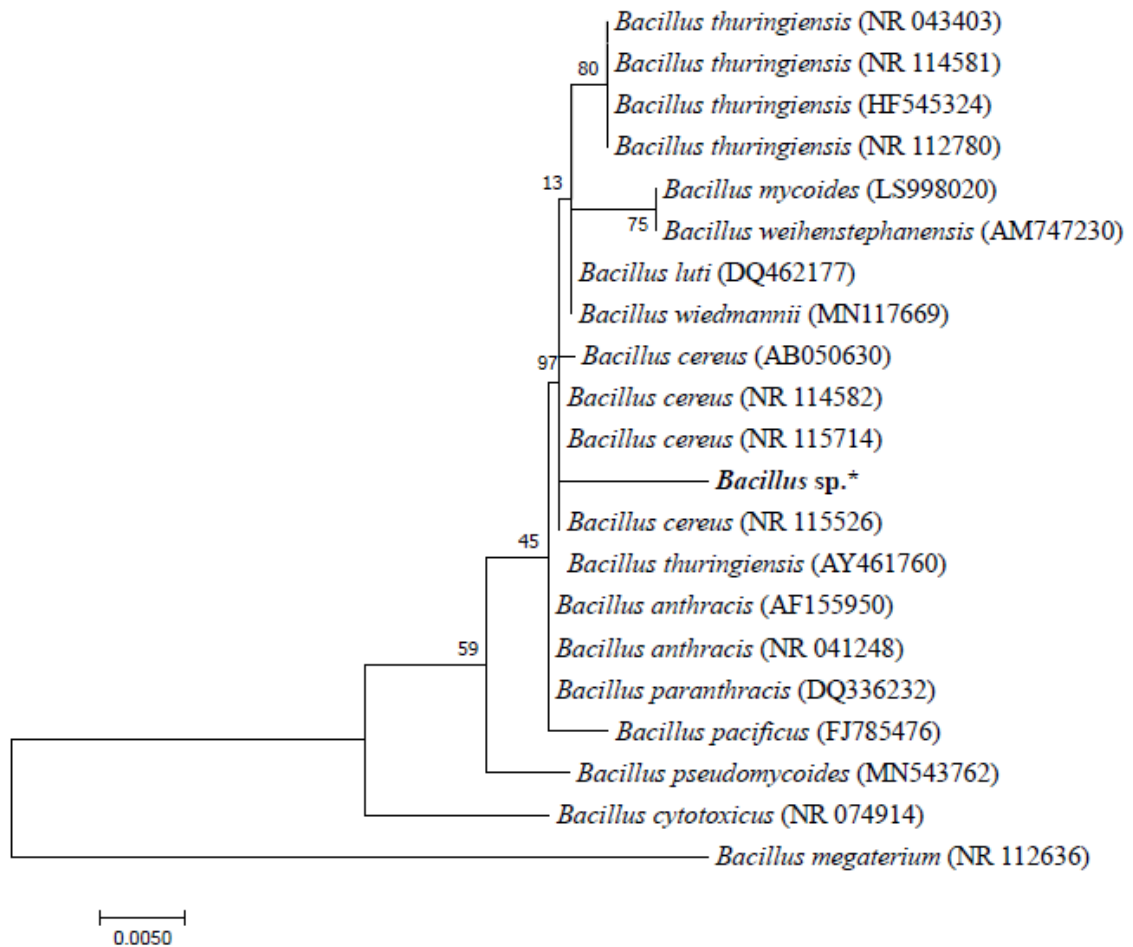
COV 0,2 kgDQOm ⁻³ d ⁻¹	Similaridade estatística (%)	Número de acesso NCBI	COV 0,6 kgDQOm ⁻³ d ⁻¹	Similaridade estatística (%)	Número de acesso NCBI
<i>Acinetobacter junii</i>	98	AJ786647.1	<i>Acinetobacter junii</i>	98	AJ786647.1
-	-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	97	M59148.1
<i>Bacillus anthracis</i>	99	NR_041248.1	<i>Bacillus anthracis</i>	99	NR_041248.1
<i>Bacillus cereus</i>	98	AB050631.1	<i>Bacillus cereus</i>	98	AB050631.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	NR_114581.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	NR_114581.1
<i>Brevibacillus reuszeri</i>	98	NR_113802.1	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	98	NR_113802.1
-	-	-	<i>Brevundinomas diminuta</i>	97	NR_117188.1
-	-	-	<i>Comamonas testosteroni</i>	98	NR_113709.1
<i>Bacillus kochii</i>	98	NR_117050.1	<i>Bacillus kochii</i>	98	NR_117050.1
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	98	NR_115724.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	98	NR_115724.1
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	98	NR_115597.1	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	98	NR_115597.1
<i>Sphingomonas koreensis</i>	97	NR_024998.1	<i>Sphingomonas koreensis</i>	97	NR_024998.1
Total = 9 espécies			Total = 12 espécies		

As sequências do gene 16S rDNA das bactérias foram comparadas ao banco de sequências do NCBI no qual, nomeou-se as bactérias da amostra por sua alta similaridade com os microrganismos da base.

O total de microrganismos com crescimento na presença de oxigênio (aeróbia) e na ausência parcial de oxigênio (aeróbia facultativa) foi de 9 espécies de bactérias para a Fase I e de 12 espécies para a Fase II, como analisado na Tabela 10.

Nesta análise foi visto que a espécie *Bacillus cereus* teve melhor crescimento nos meios de cultura utilizados em relação as demais espécies, e esta superioridade deve-se ao fato de que esta espécie é cultivável em laboratório e não é inerte metabolicamente, sendo que de acordo com Nascimento (2009) de 5 a 10% das bactérias existentes são cultiváveis em condições laboratoriais e cerca de 90% são viáveis, mas não conseguem se desenvolver em laboratório. Apesar da maior presença de *Bacillus cereus* nas LAFs não foi verificada uma remoção expressiva de cor pelo motivo de ser a bactéria mais encontrada no meio ambiente e uma das mais cultiváveis, logo, sua quantidade cultivável não estava relacionada com a presença real.

Na Figura 18 está representada a árvore filogenética da espécie *Bacillus cereus* identificada na LAF nas duas cargas aplicadas, em que os dados foram obtidos por meio do software MEGA, no qual o *Bootstrap* mais próximo de 100 indica a espécie de bactéria presente na amostra. As demais árvores estão representadas em Apêndice E.

Figura 18 - Árvore filogenética da espécie *Bacillus cereus*

Nota: A árvore filogenética foi obtida usando a união de vizinhos com *Bacillus megaterium* como grupo externo, obtendo uma réplica de 97 para a *Bacillus cereus*.

Estes microrganismos identificados no efluente Kraft também foram encontrados em outros estudos com bactérias como em Bailón-Salas et al. (2017), Chandra et al. (2012), Raj et al. (2014), Saleem et al. (2014) e Sonkar et al. (2019). A espécie de maior prioridade na amostra foi a *Bacillus cereus* e esta, por sua vez, tem característica de remoção de cor em tratamento de efluente de celulose como analisado em Saleem et al. (2014).

5.11. Ensaios de bioaugmentação

Os ensaios de bioaugmentação foram realizados com as espécies promissoras escolhidas *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus glucanolyticus* para a comparação da remoção do parâmetro cor, o qual é de difícil remoção em sistemas biológicos e em especial

nas LAF. Para o crescimento em agitador orbital do tipo Shaker com meio NB as bactérias *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* chegaram a absorvância de 0,64 em 1h30min e para a bactéria *Paenibacillus glucanolyticus* chegou a absorvância de 0,67 em 6 horas nas condições de incubação, devido ao seu crescimento em pH e temperatura abaixo das suas condições ideais, pH 9 e 37°C respectivamente (MATHEWS et al., 2014).

A concentração de bactérias foi de $6,2 \times 10^8$, $6,4 \times 10^8$ e $6,3 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de 1 mL para *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus glucanolyticus* respectivamente. Na Figura 11 está indicado o esquema dos ensaios, sendo que na biomassa havia 100 mL de efluente com 70 mg SSV L⁻¹, simulando a LAF da Fase I que apresentou uma média de COV de 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Como o efluente industrial possuía uma DQO de 360 mg L⁻¹ para a Fase III, estima-se que a média da COV para os ensaios de bioaumentação foi de 0,18 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

No ensaio de controle somente com efluente se observou o incremento dos CFT na ausência de biomassa ou bioaumentação. Assim, analisou-se que a promoção apenas da aeração é suficiente para promover aumento dos CFT no meio (MELCHIORS, 2019; PEITZ; XAVIER, 2019).

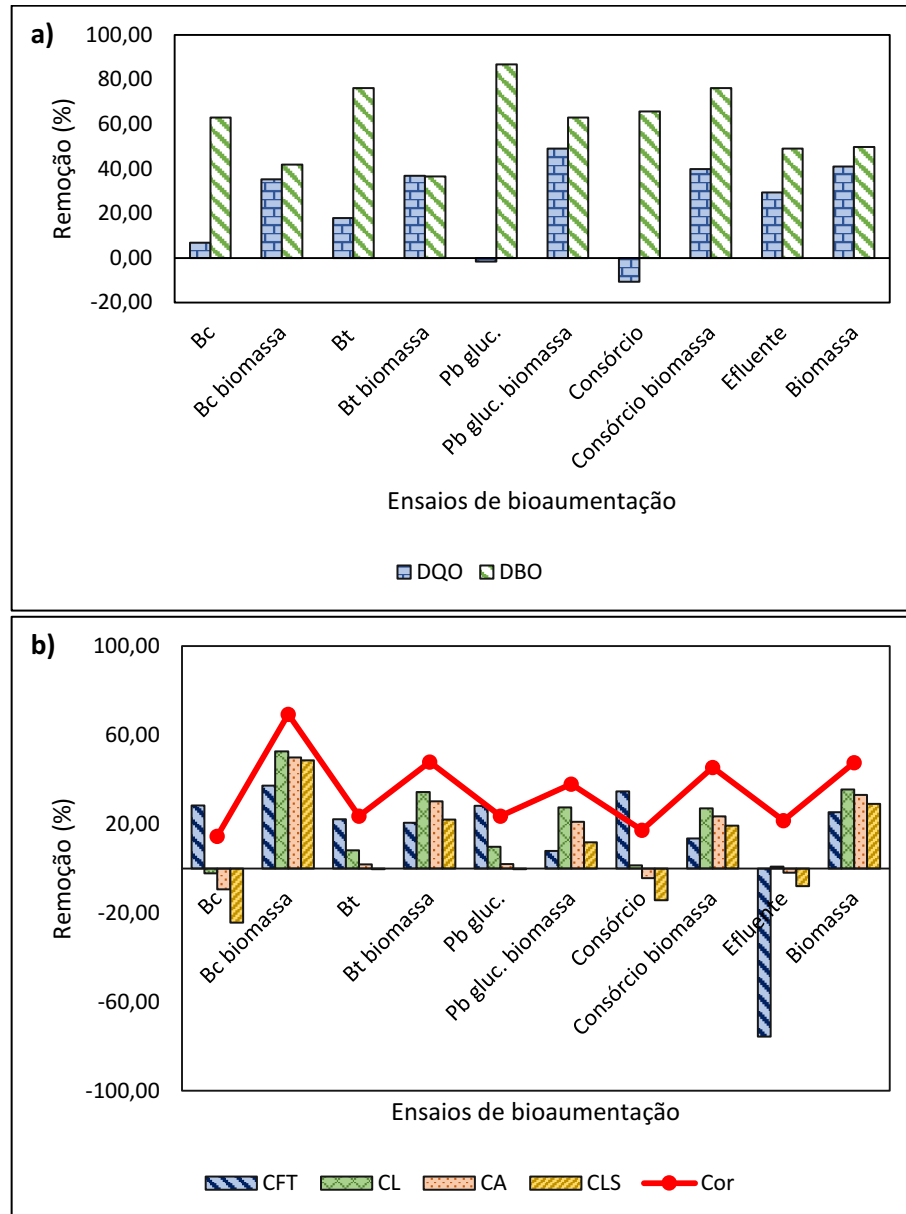
Para estes ensaios não foi realizada a pasteurização e esterilização do efluente por não ser o objetivo do trabalho e também por este estudo estar mais aproximado ao que seria aplicado na indústria que cedeu o efluente. Assim, nos ensaios de bioaumentação, mesmo na ausência de biomassa, não havia somente a espécie isolada, mas também outras, presentes na amostra de efluente industrial.

5.11.1. Avaliação da remoção da matéria orgânica e de compostos específicos no ensaio de bioaumentação

A Figura 19 apresenta os dados de remoção de matéria orgânica em termos de DBO₅, DQO e COT, e remoção de compostos específicos do efluente em termos de compostos fenólicos totais, compostos lignínicos, compostos aromáticos, compostos lignossulfônicos e cor com os ensaios de bioaumentação: *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* associado a biomassa, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* associado a biomassa, *Paenibacillus glucanolyticus*, *Paenibacillus glucanolyticus* associado a biomassa, combinado (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus glucanolyticus*), combinado (*Bacillus cereus*,

Bacillus thuringiensis e *Paenibacillus glucanolyticus*) associado a biomassa, controle efluente e controle biomassa.

Figura 19 - Resultados da bioaumentação



Nota: a) remoção da matéria orgânica em termos de DBO₅ e DQO. b) remoção dos compostos específicos do efluente Kraft. Bc – *Bacillus cereus*. Bt – *Bacillus thuringiensis*. CA – compostos aromáticos. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. CLS – compostos lignossulfônicos. DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio. DQO – demanda química de oxigênio. Pb gluc. – *Paenibacillus glucanolyticus*.

Na Figura 19 (a) observa-se que o maior destaque foi para a remoção de DBO₅ com valor superior a 90% para o ensaio contendo a bactéria *Paenibacillus glucanolyticus* em um TDH de 2,1 d, mostrando uma tendência maior para o tratamento de DBO₅. Em relação a DQO

observa-se que houve uma maior remoção para o ensaio contendo *Paenibacillus glucanolyticus* associado a biomassa, chegando a 50%.

Na Tabela 11 está representado a eficiência do tratamento de compostos específicos para as espécies isoladas ou associadas a biomassa.

Tabela 11 - Eficiência do tratamento de compostos específicos na bioaumentação

Ensaio de bioaumentação	Eficiência ¹				
	CFT	CL	CA	CLS	Cor
<i>Bacillus cereus</i>	++	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i> associado a biomassa	++	+++	+++	++	+++
<i>Bacillus thuringiensis</i>	++	+	-	-	++
<i>Bacillus thuringiensis</i> associado a biomassa	+	++	++	+	++
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	++	+	-	-	++
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> associado a biomassa	+	++	+	+	++

Nota: ¹ (+) – remoção entre 5-20%. (++) – remoção entre 30-50%. (+++) – remoção entre 60-80%. (-) – não houve remoção. CA – compostos aromáticos. CFT – compostos fenólicos totais. CL – compostos lignínicos. CLS – compostos lignossulfônicos.

Apesar do desempenho de *Paenibacillus glucanolyticus* associado a biomassa ter sido o melhor sistema para remoção da matéria orgânica global, o tratamento de compostos específicos e em especial da cor foi melhor no sistema em que foi empregado os *Bacillus cereus* associado a biomassa, como analisado na Figura 19 (b) e na Tabela 11. Nessas condições além da cor (69%) foi removido também CFT (37%), CL (53%), CA (50%) e compostos lignossulfônicos (49%).

Saleem et al. (2014) conseguiu remover cor de um tratamento de efluente de celulose empregando um isolado da bactéria *Bacillus cereus* no reator. A remoção dos parâmetros como DBO₅, DQO e cor foi de 66%, 61% e 90% respectivamente em um reator de semi-batelada com pH 6,5. Chandra et al. (2012) também empregaram a *Bacillus cereus* em tratamento de efluente de celulose, mas nesse caso eles associaram esta à *Serratia marcescens* e *Serratia liquifaciens*, que foram identificadas no efluente, e obtiveram uma remoção de cor (65%), de CFT (63%), de DQO (63%) e para DBO₅ (64%) do consórcio bacteriano para um TDH de 7 dias.

Os autores Raj et al. (2014) identificaram no efluente de celulose a bactéria *Paenibacillus* sp. visando o potencial na remoção de compostos específicos. Como resultado os autores tiveram uma remoção eficiente de cor (68%), de compostos lignínicos (54%), de fenol total (86%), de DBO₅ (83%) e de DQO (78%) em um reator de semi-batelada com TDH de 6 dias. Chandra et al. (2008) também fizeram um estudo de identificação de bactérias contidas no efluente de celulose e avaliaram que num sistema de tratamento contendo as

bactérias *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. a cor foi removida na ordem de 65% e 48% respectivamente em um TDH de 6 dias, em pH 7,6 a 30°C. No trabalho de Mathews et al. (2016) os autores isolaram a bactéria *Paenibacillus glucanolyticus* da biomassa da indústria de papel e celulose e viram nela o potencial de degradar celulose e hemicelulose e também sugeriu que esta poderia degradar também a lignina.

Sonkar et al. (2019) também identificaram as bactérias contidas no efluente de celulose e encontraram uma similaridade de 99% para *Bacillus thuringiensis* num sistema de tratamento em batelada. Nele se obtiveram remoção de DBO₅ (93%), DQO (89%), COT (82%) e cor (73%) com um TDH de 3 dias. Os autores Raj et al. (2007b) identificaram a bactéria *Bacillus thuringiensis* da biomassa da indústria de papel e celulose e encontraram uma similaridade de 97%. Em sua pesquisa observaram uma remoção de cor em 65% e de lignina em 37% ao utilizar a espécie em testes de bioaugmentação. Arous et al. (2018) utilizaram a *Bacillus thuringiensis* em consórcio com demais espécies e verificaram uma remoção em termos de DQO e CFT para o efluente de celulose de 61% e 64% respectivamente. Esses resultados utilizando bactérias iguais em diferentes países traz consigo o conceito de *Core* da microbiota.

Essas três espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus glucanolyticus* identificadas e empregadas em ensaio de bioaugmentação se mostraram promissoras na remoção de parâmetros específicos associadas a biomassa de sistema de tratamento biológico por LAF.

Em termos de aplicação o bioaumento da *Bacillus cereus* ainda não foi desenvolvido em escala plena. Entretanto, na pesquisa de Lazzaretti et al. (2001) utilizou-se 6 kg de um bioaditivo para tratar o efluente de celulose por lodos ativados com volume útil de 13000 m³ e TDH de 6 horas por 120 dias, onde foi verificado um incremento de 30% na remoção de DQO e 15% de DBO₅. O bioaditivo comercial possuía três tipos de bactérias adicionadas a farelo de cereal representando 0,01% da massa, onde a *Bacillus subtilis* compreendida 33% do conteúdo das bactérias. Nenhuma das bactérias cultiváveis, isoladas e identificadas da LAF nesse trabalho faz parte da composição do produto comercial, sendo esse resultado bastante promissor.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foi avaliado o tratamento do efluente de indústria de celulose Kraft por processo de bioaugmentação com bactérias isoladas, selecionadas e identificadas baseado em um sistema de lagoa aerada facultativa, com carga orgânica volumétrica de 0,2 e 0,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹, para remoção de compostos específicos.

As remoções de matéria orgânica em termos de DBO₅, DQO e COT para as Fases I e II foram eficientes, alcançando um total de 94%, 51% e 49% (Fase I) e 80%, 44% e 41% (Fase II) respectivamente. A cor e os CFT não foram removidos durante o tratamento, no entanto, a turbidez teve remoção de 94% para a Fase I e de 87% para a Fase II. Em relação aos compostos derivados de lignina a remoção atingiu a média de 13% para a Fase I e de 27% para a Fase II.

A partir da análise de MEEF observou-se a diminuição de intensidade de emissão de compostos fluorogênicos presentes na amostra do efluente tratado, corroborando com a remoção de compostos específicos para as duas cargas aplicadas. A biomassa atingiu uma razão SSV/SST de 0,67 para a Fase I e de 0,62 para a Fase II após 60 dias de operação das lagoas. Não foi observada toxicidade aguda na amostra industrial antes ou após o tratamento em ambas as fases.

As espécies de bactérias identificadas de amostras coletadas na zona aerada e de sedimentação das lagoas foram nomeadas por BLAST gerando alta similaridade estatística para *Acinetobacter junii* (98%), *Aeromonas hydrophila* (97%), *Bacillus anthracis* (99%), *Bacillus cereus* (98%), *Bacillus kochii* (98%), *Bacillus thuringiensis* (98%), *Brevibacillus reuszeri* (98%), *Brevundimonas diminuta* (97%), *Comamonas testosteroni* (98%), *Lysinibacillus sphaericus* (98%), *Paenibacillus glucanolyticus* (98%), *Sphingomonas koreensis* (97%).

Apesar do desempenho de *Paenibacillus glucanolyticus* associado a biomassa ter sido o melhor sistema para remoção da matéria orgânica global, o tratamento de compostos específicos e em especial da cor foi melhor no sistema em que foi empregado o *Bacillus cereus* associado a biomassa em que nessas condições além da cor (69%) foi removido também CFT (37%), CL (53%), CA (50%) e compostos lignossulfônicos (49%).

Segundo o apresentado anteriormente, pode-se afirmar que o bioaumento do isolado de *Bacillus cereus* em conjunto com a biomassa do sistema de tratamento é uma alternativa sustentável e inovadora para o tratamento do efluente da indústria, onde houve eficiência na remoção de compostos específicos do efluente Kraft em COV de 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713**: Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2016.
- ABNT. **NBR 9898**. Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987.
- ALVES, E. D.; PINHEIRO, O. S.; COSTA, A. O S.; COSTA JR.E. F. Estudo do processo de obtenção celulose Kraft com ênfase no forno de cal. **Revista Liberato**. v. 16, n. 26, p. 101-220, Novo Hamburgo, 2015.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 23 ed. Washington: American Public Health Association, 2017.
- ARDELEANU, E. R. An approach to bioremediation. **Journal of Engineering Studies and Research**. v. 17, n. 4, p. 7-12, 2011.
- ARENZON, A.; PEREIRA NETO, T. J.; GERBER, W. **Manual sobre toxicidade de efluentes industriais**. Porto Alegre: CEP SENAI de artes gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 2008.
- AROUS, F.; HAMDI, C.; KMIHA, S.; KHAMMASSI, N.; AYARI, A.; NEIFAR, M.; MECHICHI, T.; JAOUANI, A. Treatment of olive mill wastewater through employing sequencing batch reactor: Performance and microbial diversity assessment. **3 Biotech**. v. 8, n. 481, p.1-14, 2018.
- BAILÓN-SALAS, A. M.; MEDRANO-ROLDÁN, H.; VALLE-CERVANTES, S.; ORDAZ-DÍAZ, L. A.; URTIZ-ESTRADA, N.; ROJAS-CONTRERAS, J. A. Review of molecular techniques for the identification of bacterial communities in biological effluent treatment facilities at pulp and paper mills. **Bio Resources**. v. 12, n. 2, p. 4384-4409, 2017.
- BAKER, A. Fluorescence excitation-emission matrix characterization of river waters impacted by a tissue mill effluent. **Environmental Science Technology**. v.36, n. 7, p. 1377-1382, 2002.
- BELMONTE, M.; XAVIER, C.; DECAP, J.; MARTÍNEZ, M.; SIERRA-ÁLVAREZ, R., VIDAL, G. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached Kraft mill effluent due to biomass adaptation. **Journal of Hazardous Materials**. v. 135, p. 256-263, 2006.
- BOMBARDI, F. M. L.; ISHII, F. K.; PELAYO, J. S.; KOLM, H. E.; MÜLLER, M.; FABRIS, J. L. 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.
- BRAGA, L. G. C. **Estudo de biorremediação aplicada em áreas contaminadas por hidrocarbonetos derivados de petróleo**. 46 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

BRASIL. CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 430/2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. CONAMA, 2011.

BRASIL. Conselho Estadual do Meio Ambiente – CEMA. **Resolução 070/2009**. Dispõe sobre o licenciamento ambiental, estabelece condições e critérios e dá outras providências, para Empreendimentos Industriais. Diário oficial. Curitiba, 2009.

BRASIL. CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357/2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário oficial. CONAMA, 2005a.

BRASIL. **Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005**. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Diário oficial. 2005b.

BRIDGEMAN, J.; BAKER, A.; CARLIELL-MARQUET, C.; CARSTEAN, E. Determination of changes in wastewater quality through a treatment works using fluorescence spectroscopy. **Environmental Technology**. v.34, p. 3069-3077, 2013.

BUZZINI, A. P.; PIRES, E. C. Evaluation of a upflow anaerobic sludge blanket reactor with partial recirculation of effluent used to treat wastewaters from pulp and paper plants. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 1838-1848, 2007.

CABRERA, M. N. Pulp Mill Wastewater: Characteristics and Treatment, Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery. **IntechOpen**, 2017.

CARSTEAN, E. M.; BRIDGEMAN, J.; BAKER, A.; REYNOLDS, D. M. Fluorescence spectroscopy for wastewater monitoring: a review. **Water Research**. v. 95, p. 205-219, 2016.

CASTRO, K. C.; NUNES, J. V.; BORDIN, E. R.; XAVIER, C. R. Sistema de lodos ativados para remoção de matéria orgânica e compostos recalcitrantes de efluente Kraft. In: 30 Congresso Nacional de Saneamento e Meio Ambiente, 2019, São Paulo. **Anais do 30 Congresso Nacional de Saneamento e Meio Ambiente**. v. 1, p. 1-11, 2019.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Avaliação do Uso de Produtos Biotecnológicos para Tratamento de Efluentes Líquidos, Resíduos Sólidos e Remediação de Solos e Águas - L1.022**. Norma Técnica L1.022/2007. 21 f. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2021/01/L1.022_Avaliacao-do-uso-de-produtos-biotecnologicos-para-tratamento-de-efluentes-liquidos-residu-Revogada.pdf. Acesso em 16 de março de 2021.

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.

CHAMORRO, S.; POZO, Z.; JARPA, M.; HERNANDES, V.; BECERRA, J.; VIDAL, G. Monitoring endocrine activity in Kraft mill effluents treated by an Aerobic moving bed bioreactor system. **Water Science e Technology**. v. 62, p. 157-161, 2009.

CHANDRA, R.; SINGH, R.; YADAV, S. Effect of bacterial inoculum ratio in mixed culture for decolorization and detoxification of pulp paper mill effluent. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 87, n. 3, p. 436, 2012.

CHANDRA, R.; ABHISHEK, A.; SANKHWAR, M. Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 11, p. 6429-6436, 2011.

CHANDRA, R.; SINGH, S.; REDDY, M. M. K.; PATEL, D. K.; PUROHIT, H. J.; KAPLEY, A. Isolation and characterization of bacterial strains *Paenibacillus* sp. and *Bacillus* sp. for Kraft lignin decolorization from pulp paper mill waste. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 54, p. 399-407, 2008.

CHOUDHARY, A. K.; KUMAR, S.; SHARMA, C. Removal of chlorophenolics from pulp and paper mill wastewater through constructed wetland. **Water Environment Research**. v. 85, n. 1, p. 54-62, 2013.

COLLA, T. S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. 138 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2012.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTIGAN, S. L.; WERNER, J.; OUELLET, J. D.; HILL, L. G.; LAW, R. D. Expression profiling and gene ontology analysis in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver following exposure to pulp and paper mill effluents. **Aquatic Toxicology**. v. 122-123, p. 44-55, 2012.

DINIZ, C. G. **Roteiro de aulas práticas**. Disciplina: Bacteriologia Curso: Farmácia. Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Setor de Microbiologia. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.

DONATE, P. M. Environmentally friendly synthesis from biomass. **The Electronic Journal of Chemistry**. v. 6, 2014.

DUAN, J.; LIANG, 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**. v. 26, n. 10, p. 1765–1773, 2016.

DUARTE, J. C.; PEITZ, P.; XAVIER, C. R. Avaliação do tratamento de efluente Kraft com meio de suporte esponjoso em reator sequencial em batelada (RSB). In: XIV Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais XIV Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária Ambiental - SIBESA**. Foz do Iguaçu, 2018.

DYKSTRA, C. M.; GILESA, H. D.; BANERJEEB, S.; PAVLOSTATHIS, S. G. Fate and biotransformation of phytosterols during treatment of pulp and paper wastewater in a simulated aerated stabilization basin. **Water Research**. v. 68, n. 1, p. 589–600, 2015.

FARIAS, F. A.; FERREIRA, R. L. Avaliação da eficiência de diferentes agentes coagulantes na remoção de cor e turbidez em efluente de fábrica de celulose não branqueada. **Caderno Meio Ambiente e Sustentabilidade**. v.5, n. 3, p. 86-104, 2014.

FOLLMANN, H. V. D. M. **Avaliação da ultrafiltração e da adsorção em carvão ativado no tratamento avançado de efluente de uma indústria de papel e celulose**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Área de concentração em Manejo Sustentável de Recursos Florestais. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR. 79p, 2017.

FREITAS, A. C.; FERREIRA, F.; COSTA, A. M.; PEREIRA, R.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DINIZ, M. S.; CASTRO, L.; PERES, I.; DUARTE, A. C. Biological treatment of the effluent from a bleached Kraft pulp mill using *Basidiomycete* and *Zygomycete* fungi. **Science of the Total Environment**. v. 407, n. 10, p. 3282-3289, 2009.

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

GHRIBI, M.; MEDDEB-MOUELHI; F.; BEAUREGARD, M. Microbial diversity in various types of paper mill sludge: identification of enzyme activities with potential industrial applications. **Springer Plus**. v. 5, 2016.

GOUVEIA, J. J. S.; REGITANO, L. C. A. Extração de DNA. In: REGITANO L. C. A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. S. (eds). **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. 1. ed. Embrapa, São Carlos, São Paulo, p. 3-8, 2007.

GRÖTZNER, M.; MELCHIORS, E.; SCHROEDER, L. H.; SANTOS, A.R.; MOSCON, K. G.; ANDRADE, M. A.; MARTINELLI, S. H. S.; XAVIER, C. Pulp and paper mill effluent treated by combining coagulation-flocculation-sedimentation and fenton processes. **Water, Air, & Soil Pollution**. v. 229, n. 364, 2018.

GUPTA, V. K.; MINOCHA, A. K.; JAIN, N. Batch and continuous studies on treatment of pulp mill wastewater by *Aeromonas formicans*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 76, p. 547-552, 2001.

HALL, B. G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, n. 5, p. 1229-1235, 2013.

HINOJOSA, E. A. L. **Remoção de matéria orgânica e cor de efluente kraft por adsorção usando carvão ativado e argila**. 87 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2014.

HOODA, R.; BHARDWAJ, N. K.; SINGH, P. *Brevibacillus parabrevis* MTCC 12105, a potential bacterium for pulp and paper effluent degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 34, n. 2, p. 31-41, 2018.

HOSSAIN, K., ISMAIL N. Bioremediation and detoxification of pulp and paper mill effluent: a review. **Research Journal of Environmental Toxicology**. v. 9, n. 3, p. 113-134, 2015.

HUBBE, M. A.; METTS, J. R.; HERMOSILLA, D.; BLANCO, M. A.; YERUSHALMI, L.; HAGHIGHAT, F.; LINDHOLM-LEHTO, P.; KHODAPARAST, K.; KAMALI, M.; ELLIOTT, A. Wastewater Treatment and Reclamation: A review of pulp and paper industry practices and opportunities. **Bio Resources**. v. 11, n. 3, p. 7953-8091, 2016.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório IBÁ 2020**. Disponível em <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>. Acesso em: 22 de outubro de 2020.

JANHOM, T.; PAVASANT, P.; WATTANACHIRA, S. Profiling and monitoring of DOM in brewery wastewater and treated wastewater. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.176, n.1-4, p. 403-418, 2011.

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

KAMALI, M.; ALAVI-BORAZJANI, S. A.; KHODAPARAST, Z.; KHALAJ, M.; JAHANSHAHI, A.; COSTA, E.; CAPELA, I. Additive and additive-free treatment technologies for pulp and paper mill effluents: advances, challenges and opportunities. **Water Resources and Industry**. v. 21, 2019.

KAMALI, M.; KHODAPARAST, Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. **Ecotoxicology Environmental Safe**. v. 114, p. 326-342, 2015.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos – Métodos, Técnicas e Aplicações**. Florianópolis: FATMA/ GTZ, p. 289, 2004.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes industriais. **Química Nova**. v. 25, p. 78-82, 2002.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer US: New York, USA, 2006.

LAZZARETTI, E.; CAMPOS, A. F.; NOGUEIRA, J. C. B. Efeito da adição de microrganismos: bioaumento em estação de tratamento de efluentes por lodo ativado em indústria de papel e celulose. **O Papel**. v. 62, n. 8, p. 85-88, 2001.

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**. v. 211, p. 767-774, 2018.

LIANG, J.; PENG, X.; YIN, D.; LI, B.; WANG, D.; LIN, Y. Screening of a microbial consortium for highly simultaneous degradation of lignocellulose and chlorophenols. **Bioresource Technology**. v. 190, p. 381-387, 2015.

- MACHADO, E. P.; XAVIER, C. R.; COUTO, G. H. Tratamento de efluente Kraft em lagoa aerada facultativa empregando enzimas lignolíticas. **Interciencia**. v. 43, n. 8, p. 590-596, 2018.
- 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**. v. 211, p. 1389-1402, 2019.
- MANAGÓ, B. **Treatment of pulp wastewater by membrane bioreactor**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Irati, Paraná, 2019.
- MARIA, M. A.; LANGE, L. C.; AMARAL, M. Avaliação da toxicidade de efluentes de branqueamento de pasta celulósica pré e pós-degradação biológica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.19, n. 4, p. 417-422, 2014.
- MATHEWS, S. L., GRUNDEN, A. M.; PAWLAK, J. Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus glucanolyticus*. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**. v. 110, p. 79-86, 2016.
- MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J. J.; GRUNDEN, A. M. Isolation of *Paenibacillus glucanolyticus* from pulp mill sources with potential to deconstruct pulping waste. **Bioresource Technology**. v. 164, p. 100-105, 2014.
- 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. 77 f. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, UTFPR – Curitiba, 2019.
- MENEZES, W. M. **Efeito da modificação térmica em escala industrial na qualidade da madeira de *Tectona grandis* Linn. F.** 131 f. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, 2017.
- METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluente e recuperação de recursos**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.
- MORII, H.; NAKAMYIA, K.; KINOSHITA, S. Isolation of a lignin-decolorizing bacterium. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 80, p. 296-299, 1995.
- MURPHY, K. R.; HAMBLY, A.; SINGH, S.; HENDERSON, R. K.; BAKER, A.; STUETZ, R.; KHAN, S. J. Organic matter fluorescence in municipal water recycling schemes: toward a unified PARAFAC model. **Environmental Science Technology**. v. 45, n. 7, 2909-2916, 2011.
- NASCIMENTO, W. **Isolamento de Microrganismos**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2009.
- NASRAUI, P. Dimensionamento de lagoas aeradas seguidas de lagoas de sedimentação. **Hydro**. Ano – XI, n. 119. 2016.
- NUNES, J. A. **Tratamento biológico de águas residuárias**. 3. ed. Aracaju: J. Andrade, 2012.
- OLIVEIRA, S. D. **Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. 140 f. Dissertação

de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2008.

ORDAZ-DÍAZ, L. A.; VALLE-CERVANTES, S.; ROJAS-CONTRERAS, J. A.; RODRIGUEZ-FLORES, F. J.; BAILÓN-SALAS, A. M. Optimization of a microbial formulation acclimated for pilot scale biodegradation of paper mill effluent. **Bio Resources**. v. 11, n. 1, p. 1071-1079, 2016.

PARANÁ (ESTADO). Conselho Estadual do Meio Ambiente – CEMA. **Resolução 081/2010 – CEMA**. Dispõe sobre critérios e padrões de ecotoxicidade para o controle de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Paraná. Curitiba, 2010.

PEITZ, C.; XAVIER, C. R. Moving bed biofilm reactor for treatment of Kraft pulp effluent with high organic load rate. **Revista Ambiente & Água**. v. 15, n. 4, p. 1-10, 2020.

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**. v. 92, p. 70-79, 2019.

PEITZ, C.; SCHROEDER, L. H.; XAVIER, C. R. Avaliação do tratamento biológico de efluente de fábrica de celulose Kraft pela técnica de FT-IR. **O Papel**. v. 80, n. 5, p. 84-91, 2019.

PEITZ, C. **Desempenho de sistema modificado de lagoa aerada com meio de suporte em leito móvel no tratamento de efluente de celulose Kraft**. 82 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

RABELO, M. D. **Avaliação da aplicação combinada dos processos foto-fenton e biológico no tratamento de efluentes de indústria de celulose Kraft branqueada**. 102 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais, 2005.

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. **Environmental Toxicology**. v.7, p. 355-362, 2014.

RAJ, A.; CHANDRA, R.; KRISHNA, M. M. R.; PUROHIT, H. J.; KAPLEY, A. Biodegradation of Kraft lignin by a newly isolated bacterial strain, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* from the sludge of a pulp paper mill. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 793-799, 2007a.

RAJ, A., REDDY, M. M. K., CHANDRA, R.; PUROHIT, H. J.; KAPLEY, A. Biodegradação da lignina Kraft por *Bacillus* sp. isolado do lodo da fábrica de celulose e papel. **Biodegradation**. v. 18, p. 783-792, 2007b.

REYNOLDS, D. M. **Aquatic organic matter fluorescence**. COBLE, P. G.; LEAD, J.; BAKER, A., REYNOLDS, D. M.; SPENCER, R. G. M. (eds), p. 3-35, Cambridge University Press: New York, USA, 2014.

SALEEM, M; AHMAD, S. AHMAD, M. Potential of *Bacillus cereus* for bioremediation of pulp and paper industrial waste. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 823-829, 2014.

SANTOS, R.; MELLO Jr., J. A.; CARASCHI, J. C.; VENTORIM, G.; PEREIRA, F. A. Kraft and Kraft/AQ pulping from prehydrolyzed wood of hybrid *Eucalyptus urophylla* x *Grandis*. **Ciência Florestal**. v. 26, n. 4, p. 1281-1290, 2016.

SEBOK, F. O papel das florestas plantadas no efeito estufa. **Celulose online**. São Paulo, 18 de outubro de 2017. Disponível em: <https://www.celuloseonline.com.br/o-papel-das-florestasplantadas-no-efeito-estufa/#content-anchor> . Acesso em: 06 de fevereiro de 2020.

SILVA, R. **Influência do intercalante brometo de etídio na condensação do DNA induzida por espermina**: um estudo por espectroscopia de força e eletroforese em gel. 72 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, 2015.

SILVA, C. G. **Fibras celulósicas têxteis em compósitos de matriz fenólica**. 177 f. Dissertação de mestrado. Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SINGH, A. K.; YADAV, P.; BHARAGAVA, R. N.; SARATALE, G. D.; RAJ. A. Biotransformation and cytotoxicity evaluation of kraft lignin degraded by ligninolytic *Serratia liquefaciens*. **Frontiers in Microbiology**. v.10, n. 2364, p. 1-10, 2019.

SONKAR, M.; KUMAR, M.; DUTT, D.; KUMAR, V. Treatment of pulp and paper mill effluent by a novel bacterium *Bacillus* sp. IITRDVM-5 through a sequential batch process. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 20, p. 1-12, 2019.

STINGHEN, A. E. M.; ALBINI, C. A.; SOUZA, H. A. P. H. M. **Coloração de Gram**: Como fazer, interpretar e padronizar. Curitiba: Microscience, 2002. 70 p.

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**. v. 4, n. 5, p. 3721-3725, 2015.

SUHR, M.; KLEIN, G.; KOURTI, I.; GONZALO, M. R.; SANTONJA, G. G.; ROUDIER, S.; SANCHO, L. D. Best available techniques (bat) reference document for the production of pulp, paper and board. Industrial Emissions Directive 2010/75/EU (Integrated Pollution Prevention and Control). **Scientific and Technical Research Reports**. Publications Office of the European Union, 2015.

SWAMY, N. K.; SINGH, P.; SARETHY, I. P. Aerobic and anaerobic treatment of paper industry wastewater. **Research in Environment Life and Science**. v. 4, n. 4, p. 141-148, 2011.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms** – 821-R-02-012. 5th. Washington, DC, 2002.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S.; ZHAO, J. S.; PIZZIRANIKLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**. v. 61, p.137-144, 2008.

VON SPERLING, M. **Urban wastewater treatment in Brazil**. Inter-American Development Bank. Department of Sanitary and Environmental Engineering. Federal University of Minas Gerais. Brazil, 2016.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4. ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 1, 2014.

VON SPERLING, M. **Lagoas de estabilização**. 2. ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 3, 1996.

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**, v. 36, n. 6, p. 412-416, 2011.

YADAV, S. CHANDRA, R. Syntrophic co-culture of *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumonia* for degradation of kraft lignin discharged from rayon grade pulp industry. **Journal of Environmental Sciences**. v. 33, p. 229-238, 2015.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B.; EUZÉBY, J.; AMANN R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**. v. 12, p. 635-645, 2014.

APÊNDICE A – Dados da COV 0,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹

Apêndice 01 – Quadro de valores de pH, TDH e COV

	pH afluente	pH efluente	TDH (d)	COV (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
	7,00	7,90	2,01	0,20
	7,00	7,60	2,14	0,20
	7,00	7,47	1,85	0,24
	7,00	7,47	2,22	0,20
	7,00	7,57	2,38	0,19
	7,00	7,57	2,38	0,18
	7,00	7,57	2,28	0,18
	7,00	7,47	2,16	0,19
	7,00	7,45	2,16	0,19
	7,00	7,47	2,16	0,23
	7,00	7,47	2,16	0,19
	7,00	7,37	2,16	0,18
	7,00	7,37	2,08	0,20
	7,00	7,22	2,08	0,20
	7,00	7,22	1,98	0,18
	7,00	7,22	1,98	0,19
	7,00	7,22	1,67	0,22
	7,00	7,10	1,96	0,18
	7,00	7,42	1,96	0,18
	7,00	7,42	2,28	0,13
	7,00	7,42	1,89	0,19
	7,00	7,30	1,89	0,19
	7,00	7,30	1,89	0,18
	7,00	7,30	1,89	0,19
	7,00	7,30	1,89	0,19
	7,00	7,30	1,89	0,19
	7,00	7,10	1,89	0,17
Média	7,00	7,40	2,05	0,19
Desvio Padrão	0	0,17	0,17	0,02

Apêndice 02 – Quadro de valores de temperatura, ORP e OD

	Temperatura (°C)	ORP (mV)	OD zona aerada (mg L ⁻¹)	OD zona de sedimentação (mg L ⁻¹)
	22,60	-21,00	6,40	4,50
	22,20	-23,00	7,30	4,80
	25,00	-21,00	6,20	4,30
	24,00	-21,00	6,60	4,60
	20,10	-25,00	6,30	4,20
	22,60	-23,00	6,00	4,00
	25,00	-21,00	6,30	3,50
	21,80	-21,00	6,00	2,00
	22,30	-28,00	6,30	3,30
	21,50	-31,00	6,00	3,50
Média	22,71	-23,50	6,34	3,87
Desvio Padrão	1,55	3,50	0,38	0,83

Apêndice 03 – Quadro de valores de COT

	COT afluente (mg L ⁻¹)	COT efluente (mg L ⁻¹)	Remoção COT (%)
	105,07	64,60	38,52
	103,50	61,30	40,77
	99,80	38,91	61,01
	94,60	40,80	56,87
Média	100,74	51,40	49,29
Desvio Padrão	4,65	13,42	11,30

Apêndice 04 – Quadro de valores de DBO₅

	DBO ₅ afluente (mg L ⁻¹)	DBO ₅ efluente (mg L ⁻¹)	Remoção DBO ₅ (%)
	178,35	89,37	49,89
	164,84	66,08	59,91
	155,93	51,68	66,85
	166,78	37,21	77,69
	124,74	28,96	76,79
	158,90	47,52	70,09
	98,01	4,83	95,07
	100,98	24,77	75,47
	108,41	16,82	84,48
	92,07	6,00	93,48
	105,44	12,26	88,38
	127,71	16,12	87,38
	117,32	19,05	83,76
	96,53	9,38	90,28
	115,83	6,38	94,50
Média	117,31	29,10	79,60
Desvio Padrão	29,52	24,87	13,35

Apêndice 05 – Quadro de valores de DQO

	DQO afluente (mg L ⁻¹)	DQO efluente (mg L ⁻¹)	Remoção DQO (%)
	392,78	223,67	43,05
	431,89	220,56	48,93
	440,56	224,44	49,06
	443,89	217,00	51,11
	441,89	244,44	44,68
	420,56	236,78	43,70
	420,56	236,78	43,70
	413,22	223,11	46,01
	416,56	216,56	48,01
	486,67	242,78	50,11
	408,89	228,44	44,13
	382,67	223,44	41,61
	418,89	257,33	38,57
	408,89	232,44	43,15
	355,56	214,67	39,62
	377,67	223,00	40,95
	363,44	218,68	39,83
	353,67	213,57	39,61
	343,11	197,56	42,42
	287,11	101,11	64,78
	365,67	188,33	48,5
	360,00	176,11	51,08
	344,78	173,11	49,79
	351,11	176,22	49,81
	359,33	194,22	45,95
	325,22	200,78	38,26
Média	389,02	211,74	45,63
Desvio Padrão	44,84	31,23	5,65

Apêndice 06 – Quadro de valores de turbidez

	Turbidez afluente (UNT)	Turbidez efluente (UNT)	Remoção Turbidez (%)
	142,00	10,60	92,54
	143,00	3,00	97,90
	143,00	3,00	97,90
	124,00	3,00	97,58
	104,00	4,00	96,15
	183,00	3,00	98,36
	170,00	5,00	97,06
	55,00	4,00	92,73
	59,00	10,00	83,05
	42,00	5,00	88,10
Média	116,50	5,06	94,14
Desvio Padrão	49,65	2,87	5,10

Apêndice 07 – Quadro de valores de cor

	Cor afluyente (Vis_{440nm})	Cor efluente (Vis_{440nm})	Remoção cor (%)
	0,31	0,23	33,05
	0,37	0,30	22,33
	0,34	0,30	12,42
	0,30	0,55	-45,44
	0,34	0,30	-11,76
	0,33	0,30	12,67
	0,32	0,30	7,33
	0,33	0,39	-14,58
	0,31	0,31	-0,95
	0,36	0,30	20,07
	0,34	0,32	4,26
	0,29	0,28	3,18
	0,31	0,33	-5,41
	0,37	0,28	32,74
	0,25	0,25	1,19
	0,32	0,32	2,81
	0,29	0,31	-7,89
	0,32	0,32	2,81
	0,26	0,28	-8,07
	0,30	0,35	-15,17
	0,30	0,26	16,60
	0,30	0,27	12,50
	0,32	0,28	14,04
	0,29	0,29	-1,35
	0,29	0,29	0,34
	0,33	0,31	4,76
Média	0,32	0,31	4,59
Desvio Padrão	0,02	0,05	16,09

Nota: Valores negativos indicam incremento do parâmetro.

Apêndice 08 – Quadro de valores de CFT

	CFT afluente (mg L⁻¹)	CFT efluente (mg L⁻¹)	Remoção CFT (%)
	192,37	169,19	13,70
	198,70	190,17	4,49
	199,86	220,95	-9,55
	166,56	143,38	16,17
	172,89	93,27	85,37
	199,86	396,02	-49,53
	166,56	396,02	-57,94
	170,78	418,22	-59,17
	166,55	223,35	-25,43
	89,48	104,10	-14,04
	220,58	135,54	62,74
	100,72	137,00	-26,48
	89,48	104,10	-14,04
	100,72	137,00	-26,48
	130,51	173,31	-24,70
	164,97	192,78	-14,43
	77,87	123,12	-36,75
	164,97	192,78	-14,43
	54,20	123,12	-55,98
	193,54	296,29	-34,68
	54,20	122,82	-55,87
	102,15	139,21	-26,62
	114,03	141,52	-19,42
	77,87	123,12	-36,75
	77,87	123,12	-36,75
	112,85	142,49	-20,80
Média	136,93	183,15	-18,36
Desvio Padrão	51,10	92,58	33,95

Nota: Valores negativos indicam incremento do parâmetro.

Apêndice 09 – Quadro de valores de compostos derivados de lignina

	Aromáticos afluente (UV _{254nm})	Aromáticos efluente (UV _{254nm})	Remoção aromáticos (%)	Lignossulfônicos afluente (UV _{346nm})	Lignossulfônicos efluente (UV _{346nm})	Remoção lignossulfônicos (%)	Lignínicos afluente (UV _{280nm})	Lignínicos efluente (UV _{280nm})	Remoção lignínicos (%)
	3,10	2,39	29,55	0,84	0,76	10,35	2,61	1,94	34,48
	3,98	2,90	37,19	1,07	0,90	18,63	3,08	2,39	28,82
	3,85	3,12	23,34	1,02	0,95	7,43	3,15	2,59	21,83
	4,01	4,30	-6,92	1,07	1,15	-6,34	3,00	3,08	-2,72
	3,64	3,27	11,34	0,98	1,02	-3,51	2,94	2,75	6,90
	4,31	3,25	32,60	1,16	0,89	30,79	3,41	2,65	28,51
	4,01	3,25	23,34	1,07	0,89	21,12	3,20	2,65	20,53
	3,70	3,37	9,84	1,05	1,09	-4,28	3,02	2,87	5,22
	3,84	3,32	15,81	1,15	1,09	5,68	3,12	2,80	11,23
	3,68	2,93	25,59	1,04	0,91	14,47	2,88	2,44	17,86
	3,78	3,41	10,77	1,04	1,11	-6,55	3,09	2,80	10,34
	3,77	3,82	-1,23	1,07	0,96	11,81	3,00	2,82	6,27
	3,99	3,35	18,96	1,15	1,06	8,23	3,22	2,86	12,41
	3,87	3,16	22,25	1,08	1,07	1,31	3,22	2,62	22,92
	3,24	2,95	10,03	0,96	0,95	1,58	2,65	2,45	7,77
	3,98	3,05	30,46	1,13	1,05	7,18	3,28	2,63	24,82
	3,88	3,51	10,59	1,17	1,10	7,00	3,01	2,86	5,34
	3,98	3,05	30,46	1,13	1,05	7,18	3,28	2,63	24,82
	2,88	3,57	-19,14	0,84	0,87	-4,11	2,33	2,65	-12,06
	3,38	3,81	-11,47	1,10	1,30	-15,21	2,88	3,35	-13,91
	3,29	2,61	26,26	1,06	0,91	17,36	2,66	2,23	19,14
	3,03	2,88	5,19	0,93	0,97	-3,80	2,64	2,43	8,93
	3,16	2,85	10,85	1,00	0,97	3,19	2,64	2,47	6,96
	3,03	2,24	35,49	1,17	0,88	32,40	3,01	2,71	11,07
	3,88	3,16	22,71	1,17	0,89	31,95	3,99	3,72	7,33
	3,21	2,72	17,84	1,01	0,85	17,85	2,65	2,11	25,15
Média	3,64	3,17	16,22	1,06	0,99	8,14	3,00	2,68	13,08
Desvio Padrão	0,39	0,44	14,44	0,09	0,11	12,42	0,33	0,35	12,00

Nota: Valores negativos indicam incremento do parâmetro.

Apêndice 10 – Quadro de valores de SST e SSV

	SST (mg L ⁻¹)	SSV (mg L ⁻¹)	SSV/SST
	1136,25	772,45	0,67
	1148,50	786,32	0,68
	1125,00	742,83	0,66
Média	1136,58	767,20	0,67
Desvio Padrão	11,75	22,21	0,01

APÊNDICE B – Dados da COV $0,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$

Apêndice 01 – Quadro de valores de pH, TDH e COV

	pH afluente	pH efluente	TDH (d)	COV (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
	7,00	7,43	1,26	0,61
	7,00	7,40	1,19	0,55
	7,00	7,30	1,19	0,54
	7,00	7,35	1,26	0,47
	7,00	7,36	1,26	0,58
	7,00	7,60	0,98	0,51
	7,00	7,57	0,98	0,66
	7,00	7,55	1,16	0,73
	7,00	7,45	1,16	0,6
	7,00	7,50	1,16	0,62
	7,00	7,36	1,21	0,64
	7,00	7,37	1,21	0,63
	7,00	7,42	1,21	0,55
	7,00	7,64	1,32	0,77
	7,00	7,80	1,32	0,68
	7,00	7,70	1,32	0,54
	7,00	7,40	1,21	0,57
	7,00	7,46	1,21	0,61
	7,00	7,42	1,19	0,55
	7,00	7,42	1,21	0,54
	7,00	7,42	1,21	0,47
	7,00	7,20	1,19	0,58
	7,00	7,22	1,07	0,51
	7,00	7,22	1,08	0,59
	7,00	7,20	1,07	0,60
	7,00	7,19	1,08	0,58
Média	7,00	7,42	1,18	0,58
Desvio Padrão	0	0,15	0,09	0,07

Apêndice 02 – Quadro de valores de temperatura, ORP e OD

	Temperatura (°C)	ORP (mV)	OD zona aerada (mg L ⁻¹)	OD zona de sedimentação (mg L ⁻¹)
	17,00	-23,00	3,50	1,50
	17,20	-23,00	3,50	1,50
	18,00	-15,00	3,50	1,50
	16,00	-36,00	3,50	1,50
	24,10	-36,00	3,50	1,50
	24,60	-19,00	3,50	1,50
	22,00	-21,00	3,50	1,50
	21,80	-52,00	3,50	1,50
	24,30	-29,00	3,50	1,50
	22,00	-36,00	3,50	1,50
Média	20,70	-31,00	3,50	1,50
Desvio Padrão	3,32	11,90	0	0

Apêndice 03 – Quadro de valores de COT

	COT afluente (mg L⁻¹)	COT efluente (mg L⁻¹)	Remoção COT (%)
	97,56	67,81	30,49
	86,70	36,34	58,08
	207,61	135,90	34,54
Média	130,62	80,01	41,03
Desvio Padrão	66,89	50,89	14,89

Apêndice 04 – Quadro de valores de DBO₅

	DBO₅ afluente (mg L⁻¹)	DBO₅ efluente (mg L⁻¹)	Remoção DBO₅ (%)
	330,72	146,28	55,77
	187,62	141,51	24,58
	252,20	68,37	72,89
	240,70	46,11	80,84
	190,60	12,80	93,28
	189,50	9,60	94,93
	203,52	20,30	90,03
	352,98	17,49	95,05
	283,02	36,57	87,08
	407,04	27,03	93,36
	206,70	47,70	76,92
	295,74	36,57	87,63
	219,42	50,88	76,81
	210,00	46,80	77,71
	189,60	32,60	82,81
	188,50	35,10	81,38
	188,10	35,80	80,97
Média	243,29	47,73	79,53
Desvio Padrão	67,64	39,12	17,23

Apêndice 05 – Quadro de valores de DQO

	DQO afluente (mg L⁻¹)	DQO efluente (mg L⁻¹)	Remoção DQO (%)
	728,00	306,11	57,95
	648,89	318,22	50,96
	647,67	308,67	52,34
	593,22	353,56	40,40
	732,33	323,56	55,82
	595,33	398,56	33,05
	770,78	359,78	53,32
	885,89	392,44	55,70
	798,44	463,22	41,98
	816,11	424,11	48,03
	847,11	516,22	39,06
	831,56	454,67	45,32
	723,78	350,67	51,55
	819,11	488,78	40,33
	731,67	447,89	38,79
	581,00	443,78	23,62
	610,50	440,9	27,78
Média	727,14	399,47	44,47
Desvio Padrão	98,94	66,51	10,08

Apêndice 06 – Quadro de valores de turbidez

	Turbidez afluente (UNT)	Turbidez efluente (UNT)	Remoção Turbidez (%)
	92,00	34,00	70,58
	92,00	34,00	70,58
	92,00	21,00	77,17
	93,00	28,00	69,89
	93,00	31,00	68,36
	93,00	21,00	77,42
	195,00	15,00	92,3
	183,00	16,00	91,25
	236,00	12,00	94,9
	178,00	9,00	94,9
Média	134,70	22,10	80,73
Desvio Padrão	56,56	9,19	11,28

Apêndice 07 – Quadro de valores de cor

	Cor afluyente (Vis_{440nm})	Cor efluente (Vis_{440nm})	Remoção cor (%)
	0,45	0,39	13,53
	0,36	0,50	-28,01
	0,48	0,37	28,27
	0,42	1,24	-65,57
	0,45	0,37	20,63
	0,45	0,51	-11,46
	0,64	0,53	20,22
	0,65	0,52	24,38
	0,76	0,69	10,25
	0,85	0,71	20,82
	0,92	0,81	13,58
	0,92	0,82	12,35
	0,91	0,63	43,87
	1,14	0,85	34,04
	0,92	0,84	9,52
	1,05	0,87	20,32
	0,95	0,87	8,45
Média	0,72	0,68	10,30
Desvio Padrão	0,25	0,23	25,43

Nota: Valores negativos indicam incremento do parâmetro.

Apêndice 08 – Quadro de valores de CFT

	CFT afluente (mg L ⁻¹)	CFT efluente (mg L ⁻¹)	Remoção CFT (%)
	336,39	329,11	2,21
	336,39	329,11	2,21
	359,22	243,69	47,41
	334,78	373,26	-10,31
	263,62	147,33	78,93
	246,98	248,45	-0,59
	383,37	233,24	64,37
	443,86	230,45	92,61
	397,73	337,62	17,8
	384,6	316,67	21,45
	424,9	362,54	17,2
	410,08	409,96	0,03
	295,11	219,98	34,15
	355,05	303,85	16,85
	350	356,65	-1,86
	352,6	356,65	-1,14
	351,8	353,8	-0,57
Média	354,49	303,08	22,39
Desvio Padrão	52,49	70,15	30,93

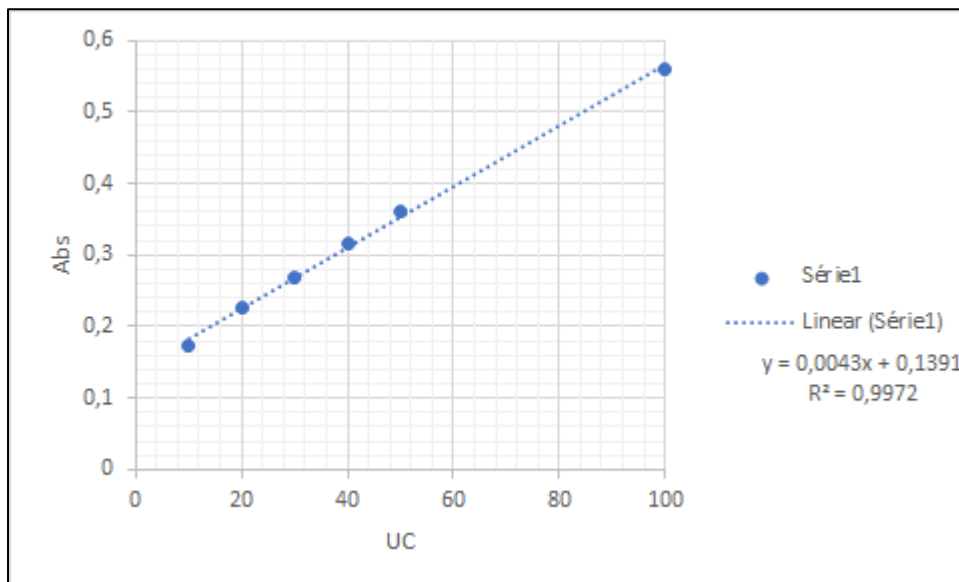
Apêndice 09 – Quadro de valores de compostos derivados de lignina

	Aromáticos afluente (UV _{254nm})	Aromáticos efluente (UV _{254nm})	Remoção aromáticos (%)	Lignossulfônicos afluente (UV _{346nm})	Lignossulfônicos efluente (UV _{346nm})	Remoção lignossulfônicos (%)	Lignínicos afluente (UV _{280nm})	Lignínicos efluente (UV _{280nm})	Remoção lignínicos (%)
	5,39	4,39	22,58	1,61	1,30	23,17	4,57	3,84	19,19
	5,52	5,61	-1,74	1,69	1,84	-7,77	5,11	4,65	9,79
	5,72	4,05	41,12	1,08	1,05	2,95	4,95	3,34	48,07
	5,51	4,81	14,36	1,83	1,47	24,10	4,86	3,74	29,85
	5,32	3,53	50,67	1,39	1,10	26,52	4,81	2,91	65,34
	6,06	5,51	10,03	1,71	1,78	-3,70	4,87	4,26	14,53
	6,38	4,91	29,95	1,67	1,40	19,24	5,88	4,12	42,54
	7,39	5,19	42,23	2,18	1,68	29,71	6,64	4,31	53,90
	8,51	6,51	30,84	2,72	1,90	43,50	7,28	5,36	35,89
	7,04	6,68	5,29	1,91	2,20	-13,11	6,62	5,56	19,08
	7,29	6,50	12,29	2,05	2,21	-7,15	6,66	5,74	16,07
	8,39	7,95	5,65	2,54	2,66	-4,62	7,04	6,28	12,16
	7,90	7,09	11,37	2,11	2,15	-2,13	7,45	6,10	22,22
	7,45	7,92	-5,87	2,12	2,33	-8,85	6,83	6,27	8,97
	7,42	7,35	0,92	2,12	2,18	-2,80	6,81	6,14	10,75
	9,88	7,47	32,28	2,91	2,39	21,57	10,17	7,66	32,80
	8,5	7,69	10,53	2,56	2,39	6,80	7,60	6,36	19,50
Média	7,03	6,06	18,38	2,01	1,88	8,67	6,36	5,09	27,09
Desvio Padrão	1,34	1,42	16,75	0,48	0,48	16,98	1,43	1,31	16,92

Apêndice 10 – Quadro de valores de SST e SSV

	SST (mg L ⁻¹)	SSV (mg L ⁻¹)	SSV/SST
	2200	1300	0,59
	2150	1250	0,58
	2100	1450	0,69
Média	2150	1333	0,62
Desvio Padrão	11,75	22,21	0,01

APÊNDICE C – Curva analítica de cor



Para se obter a cor em mg Pt L^{-1} , primeiramente foi realizada a medida da absorbância por UV Vis no comprimento de onda de 440nm, que aparece no eixo Y e posteriormente convertida para mg Pt L^{-1} de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Cor (mg Pt/L)} = \frac{(\text{abs Vis } 440 \text{ nm} - 0,1391)}{0,0043}$$

APÊNDICE D – Sequências genéticas das bactérias identificadas

>Consensus_ *Bacillus cereus*

CTAATAC-TGC-AGTCGAGC-
 GAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGG-
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG-
 CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
 TAACGGCTCACCAAGGGAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC-
 ---GGGTCG-TAAAACTC----TGTTGTTA----GGGAAGAACAAG-TGCT--A-GTT---
 GAATAAGCT---GGCACCTTGA--CGGTACCTAACC----AGAAAG--CCACGGCT-
 AACTACG-TGCCAG---CAGCCGC----GGTAATACGTA-GGTGG-C-
 AAGCGTTATCCGG---AATTATTGGGCGTAAAG---CGCGCGCA-GGT--
 GGTTTCTTAAGTCT---GATGTG-AAAG-CCCACGGCTCAA-CCGT-GGAGGG--TCA-
 TTGG--AAACTGGGAGA---CTTGAGTGCAGAAGAGG-AAA--GTGGAA-TTCCAT-GT-
 GTAG-CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGT-
 GGCGAAGGCGACTTTCTGG-TCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGT-
 GGGGAGCAAACA-
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG
 GTTTCCG-CCCTTTAGTGCTGAAG-TTAACGCATT-AAGCACT-CCGCCT---
 GGGGAGTACGG-CCGCAA-GGCTGAAACTCAAA-GGAA---TTGAC-
 GGGGGCCCGCACAAAGCGG--TGGAGCAT--GTGGTTT--AATTC--GAAGCAACG-
 CGAAGAA--CCTTA----CCAGGTC--TTGACAT-CCTCT--GAAAA-CCCT---
 AGAGATAGGG---CTTC--TCCTTC--GGGAG--CAG-AGTGA---CAGGTGGT-GC--
 ATGGTTG-TCG-TCAGCTC--GTGT-CGT--GAGATGT-----TGGGTAAAG--
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAT-
 CATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA---CACGTGCTA-
 CAATG-
 GACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTT
 CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
 TCA-CACCACGAGAGTTTGT---AACACCCGAAGTCCGGTGGGGTAACCTTT-T-
 GAGCCAGCCGCCAAGAGTCATAGC

>Consensus_ *Bacillus anthracis*

TA-TAC-TGCA-GTCGAGC-
 GAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGG-
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG-
 CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
 TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC-
 ---GGGTCG-TAAAACTC----TGTTGTTA----GGGAAGAACAAG-TGCT--A-GTT---
 GAATAAGCT---GGCACCTTGA--CGGTACCTAACC----AGAAAG--CCACGGCT-
 AACTACG-TGCCAG---CAGCCGC----GGTAATACGTA-GGTGG-C-
 AAGCGTTATCCGG---AATTATTGGGCGTAAAG---CGCGCGCA-GGT--
 GGTTTCTTAAGTCT---GATGTG-AAAG-CCCACGGCTCAA-CCGT-GGAGGG--TCA-
 TTGG--AAACTGGGAGA---CTTGAGTGCAGAAGAGG-AAA--GTGGAA-TTCCAT-GT-
 GTAG-CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGT-
 GGCGAAGGCGACTTTCTGG-TCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGT-
 GGGGAGCAAACA-
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG
 GTTTCCG-CCCTTTAGTGCTGAAG-TTAACGCATT-AAGCACT-CCGCCT---
 GGGGAGTACGG-CCGCAA-GGCTGAAACTCAAA-GGAA---TTGAC-
 GGGGGCCCGCACAAGCGG--TGGAGCAT--GTGGTTT--AATTC--GAAGCAACG-
 CGAAGAA--CCTTA----CCAGGTC--TTGACAT-CCTCT--GACAA-CCCT---
 AGAGATAGGG---CTTC--TCCTTC--GGGAG--CAG-AGTGA---CAGGTGGT-GC--
 ATGGTTG-TCG-TCAGCTC--GTGT-CGT--GAGATGT-----TGGGTAAAG--
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAT-
 CATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA

>Consensus_ *Lysinibacillus sphaericus*

ATGCAGTCGAGCGGA-CA--GATAAGGAGCTTGCTCC--T-
 TTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTG
 GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC-GAATAATCTTTTGTCTCTCATGA-
 GACAATT-CTGAAAGACGGT-
 TTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
 GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTCCGGT
 CGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAC-
 TGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
 GCGCAGGTGG-
 TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAAC
 TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTCTGTAAC
 GACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGC
 AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
 AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAG
 TTTT-
 CCCTTCGGGGACAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
 AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCA--
 TTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
 TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
 CGATACAAACGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAG-
 TCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCT
 AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC
 GCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT—
 TGGAGCCAG

>Consensus_ *Brevibacillus reuszeri*

CGCTGGCGGCGT----ATACATGCAAGTCGAGCGAGT-----CTCTTCGG-----

AGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGG
ATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTG-
GATCGCATGATCCGAAAAGAAAAGGCGGC-TTC-
GGCTGTCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGC
CTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAAT
GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGT
AAAGTTCTGTTGTTAGGGACGAAC-----AAGTACC-
GTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACT-
AC-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA--TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA-
TTGGGCGTAAAGC-GCGCGCAGGCGGCTATGTAAG---TCTGGTGT-
TAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGTTCG-CATCGGAAACTGTG-
TAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTG-
TAGCGGTGAAATGCGTAGAG--ATGTGGAGGAACACC-
AGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG-
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTT
TCAATACCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCT-
GGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGAC-
GGGGGCCCGCACAAGC-
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA-
CCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCT-GGAGACAGAGC---
TTCCCTTCGGGGCAGCGG-TGACAGGTGG-
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGG--TTAAGTCCCGCAACGA-
GCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGC
CGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGACGCTAGCCCGCGA
GGGTATGCCAATCTCTTAAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGC
CTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGGGAGTTTGC-
AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC-GCAAGGAGCCAGCCGCGGATGGTGTTC

>Consensus_ *Bacillus thuringiensis*

ATACATGCAAGTCGAGC-
 GAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGG-
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG-
 CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
 TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC-
 ---GGGTCG-TAAAACTC----TGTTGTTA----GGGAAGAACAAG-TGCT--A-GTT---
 GAATAAGCT---GGCACCTTGA--CGGTACCTAACC----AGAAAG--CCACGGCT-
 AACTACG-TGCCAG---CAGCCGC----GGTAATACGTA-AGTGG-C-
 AAGCGTTATCCGG---AATTATTGGGCGTAAAG---CGCGCGCA-GGT--
 GGTTTCTTAAGTCT---GATGTG-AAAG-CCCACGGCTCAA-CCGT-GGAGGG--TCA-
 TTGG--AAACTGGGAGA---CTTGAGTGCAGAAGAGG-AAA--GTGGAA-TTCCAT-GT-
 GTAG-CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGT-
 GGCGAAGGCGACTTTCTGG-TCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGT-
 GGGGAGCAAACA-
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG
 GTTTCCG-CCCTTTAGTGCTGAAG-TTAACGCATT-AAGCACT-CCGCCT---
 GGGGAGTACGG-CCGCAA-GGCTGAAACTCAAA-GGAA---TTGAC-
 GGGGGCCCGCACAAAGCGG---TGGAGCAT--GTGGTTT--AATTC--GAAGCAACG-
 CGAAGAA--CCTTA----CCAGGTC--TTGACAT-CCTCT--GAAAA-CCCT---
 AGAGATAGGG---CTTC--TCCTTC--GGGAG--CAG-AGTGA---CAGGTGGT-GC--
 ATGGTTG-TCG-TCAGCTC--GTGT-CGT--GAGATGT-----TGGGTAAAG--
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAT-
 CATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA---CACGTGCTA-
 CAATG-
 GACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTT
 CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
 TCA-CACCACGAGAGTTTGT---
 AACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTG

>Consensus_ *Bacillus kochii*

CTAATACATGCAAGTCGAGCG--AATCTGAGGGAGCTTGCTCCCAA---
 GATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
 TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAA-
 TATCTATTTATACATATAATTAGA-TTGAAAGATGG--
 TTCTGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
 GGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
 GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
 AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGAT
 C--GTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAAC-
 TGCCGGTACCTT--GACGGT--ACCTAACCAGAAAGCCAC---
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC--AAGCGTTGTCC-
 GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG--
 CGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTC-
 AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
 AATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGA
 GGGTTTCCGCC--TTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCG-
 CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG--
 CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT-
 GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAA
 TCCTAGA-GATAGGACTTTCCC---CTTCGGGGGACAGAGTGA-----
 CAGGTGGTGCATGGTTGTC--GTCAGCTCGTGTCGT---
 GAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCA
 TTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
 TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
 TGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATAAAACCATTCTC
 AGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCG
 CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA
 CACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTT-----
 -----TGGAGCCAGCCGCCTAAGGGGGGTACG

>Consensus_*Paenibacillus glucanolyticus*

GGAC--G--T--A---CTT--GCACTCTTG-AGAGT-
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGACTGGGATAA
CTA-CCGGAAACGGTAGCTAATACCGGATAA-
TTTATTACATAGCATTATGTGATAATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGGGGA
TGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GTCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAACTGAC
GGAGCAA--CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC---GGATCGTA-
AAGCTCTGTTGSCAAGGAAGAACGTAT-TCTAGAGTAACT-GTT-
ATGAGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA-
GCCGCGGTAA-TACGTAGGGGGCAAGCGTTGT-CCGGAATTATTGGG-
CGTAAAGCGCGCGCAGG--CGGTCCTTTAAGTCTGGTG-TTTAAACC-
CGGGGCTCAACT-TCGGGTCG-CACTGGAAACT-
GGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATGTGGAGG-AACACCA-
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT--
AAACGATGAATGCTAGGTGTTA-
GGGGTTTTGATAACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGA
GTACGGTTCGCAAGCACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAG
TGGAGTATGTGGTTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG--
TCTTGACATCCCTCTGAATCTG-CTAGAG-----ATAGAGG-CGGCCTTC--
GGGACAGAGG-AGACAGGTGGTGC-ATGGTTGTCG-
TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG-
CGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCAGGTAAG-
GCTGGGCACTCTAGAATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGG-
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTTGGGCTACACACGTACTACAAT
GGCTGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCTATAAAAAGCCA
GTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCC
CGTCACACCA-CGAGAGTTTACAACACCCGAAG-
TCGGTGGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCTCGGAAGATGCGTTTG

>Consensus_*Acinetobacter junii*

CGCT-----ACACATGC-
 AGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTGCACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA
 ATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATA
 CCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAT--
 CTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT
 AAAGGCCTACCAAGGCGAC--
 GATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTG
 ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGC
 GAGGAGGAGGCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAAT
 AAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGT
 TAATCGGATTTACTGGGCGT-AAAGCGTGCGTAGG--
 CGGCTTTTTAAGTCGGATGTGAAAT-CCCCGAGCTTAA--
 CTTGGGAATTGCATTCGATACTGGGAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAA-
 TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
 GCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGC
 CTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG-
 CATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACTAG
 AAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATG
 GCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
 CCTTTTCCTTACTTGCCAGC-
 ATTTTCGGATGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGG
 GACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG
 GTCGGTACAAAGGGTTGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATC
 GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
 CGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
 CACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGGTAGTCTAACCGCAAGGAGGAC
 GCTTACCACGGTGTGGCCGATGA

>Consensus_*Comamonas testosteroni*

TAAGAC-AGTGGTCAAATCCCCGGGC-

TCAACCTGGGAACTGCCATTGTGACTGCAAAGCTAGAGTGCGGCAGAGGGGGAT
GGAATTCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGC
GAAGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTG
GGTCTTAACTGACTCAGTAACG-AAGCTAACGCGTGAAGTTGACC-
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG--TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA--
CCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTAC
CCACCTTTGACATGGCAGGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCTCGAAAGAGAAC
CTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACATTCAGTTGAGCACTC
TAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC
ATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATAACAATGGCTGGTACAAAGGGTTG
CCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAG
TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTC
ACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCGG
GTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCC-TAACCGCAAGGAGGGC

>Consensus_ *Aeromonas hydrophila*

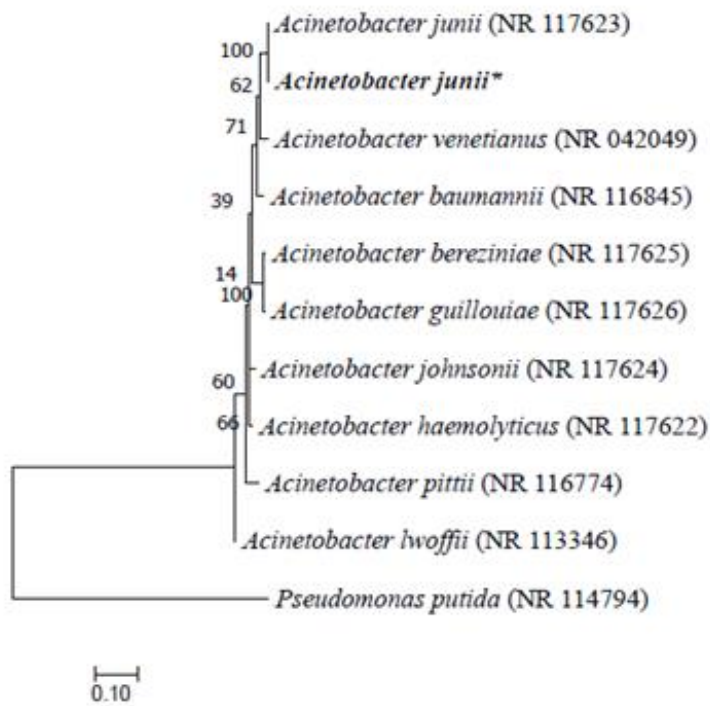
GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
GAGCGGCAGCGGGAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTG
AGTAATGCCTGGGAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGC
TAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGA
TTGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCC
TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCA
GCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGCAGA
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGAT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTC
TTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAAT
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
CTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCA
GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACT
CAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT
CATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCT
GCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGA
GTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGT
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG
GGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGA
TTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA

>Consensus_ *Brevundimonas diminuta*

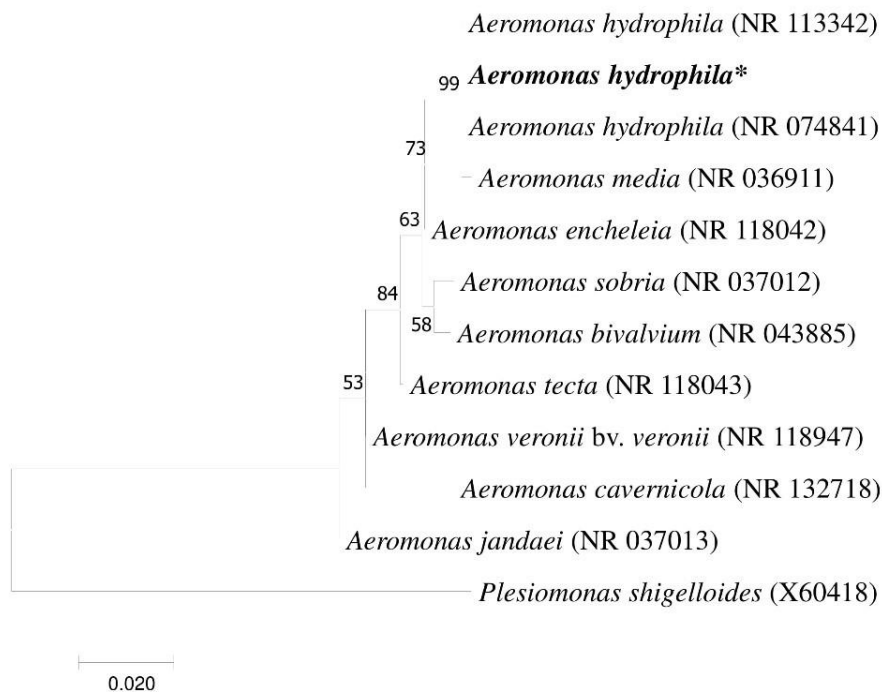
CATGCAAGTCGAACGGACCCTTC--GGGGTTAGTGGCGGAC-
GGGTGAGTAACACGTGGGAACGTGCCTTTAGGTTTCGGAATAGCTCCTGGAAACG
GGTGGTAATGCCGAATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCCTTTAGAGCGGC
CCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTA
GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGA-
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA-GCAGTGGGGAATCTTGCG-
CAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCCGCGTGAATGATGAAGGTCTTAGGA
TTGTAAAA-TTCTTTCAC-
CGGGGACGATAATGACGGTACCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGAA-GGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATTAAGGGCGTAAA-
GGGCGCGTAGGCGGATCGTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGG
AACTGCCTTTGATACT-GGCGATCTT-
GAGTATGAGAGAGGTATGTGGAACCTCCGAGTGTAGAGGTGAAA-
TTCGTAGATATTCGG-AAGAACACCAGTGGCG-AAGGCGACATACTGGCT-
CATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTGCT-AGTTGTCGGGCTGCAT-
GCAGTTCGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAA-
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGCAGAACCTTACCACCTTTTG
ACATGCCTGG-ACCGCCACGGAGACGTGGCT-TTCCC---
TTTCGGGGACTAGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC-AGCTCGTG-
TCGTGAGATGTTGGG---TTAAGTCCCGCAAC--GAGCGCAACCC-
TCGCCATTAGTTGCCATCA--TTAGTTGGGCACTCTAATGGG-
ACTGCCGGTGCTAAGCCG-
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACAGGGTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGCAACTACAGAGGGTT-----
AATCCTTAAAAGTTGTCTCAGTTC-
GGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAAT-
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT-
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCG-AAG-
GCGGTGCGCTAATCT----CAGCAA

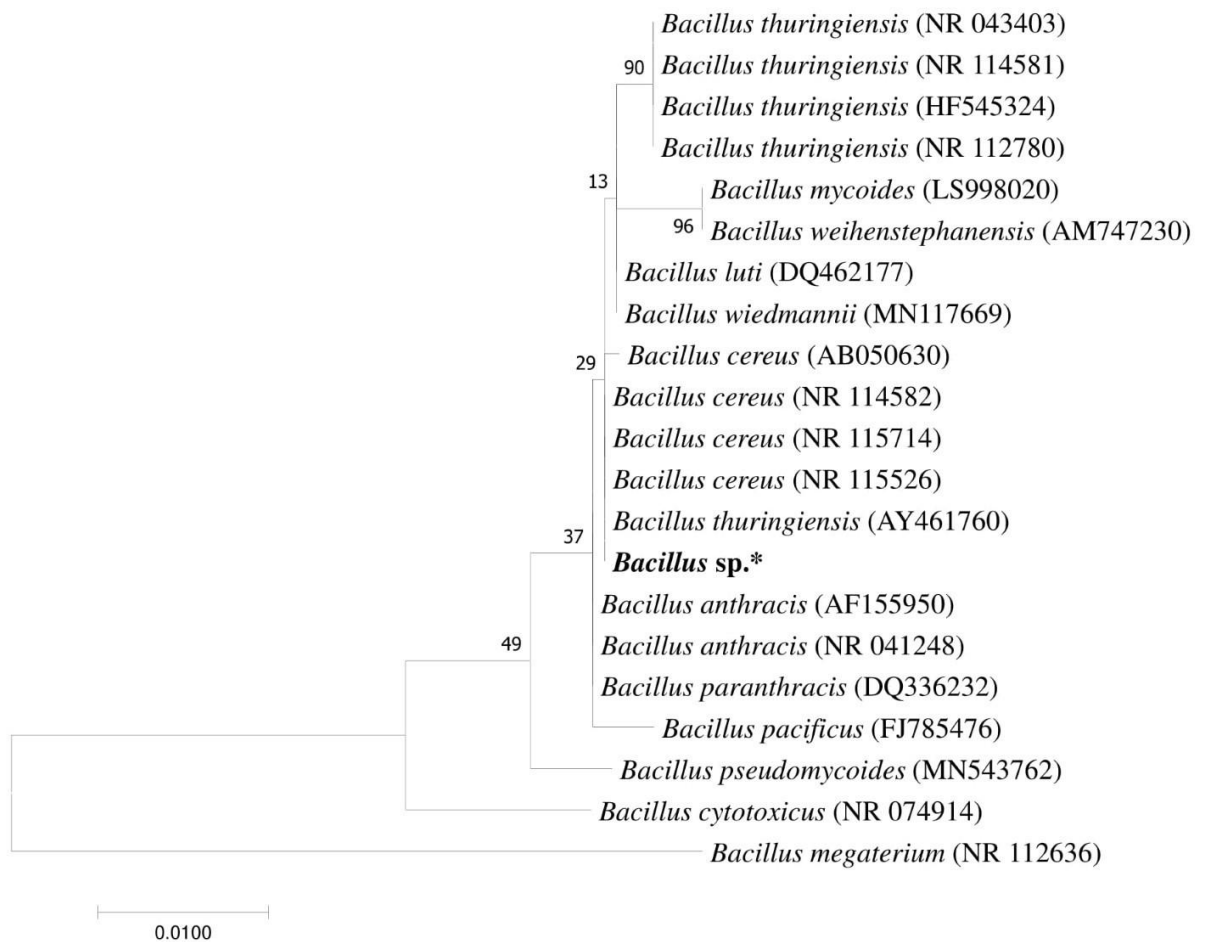
APÊNDICE E – Árvores filogenéticas das espécies de bactérias identificadas

Árvore filogenética da espécie *Acinetobacter junii*

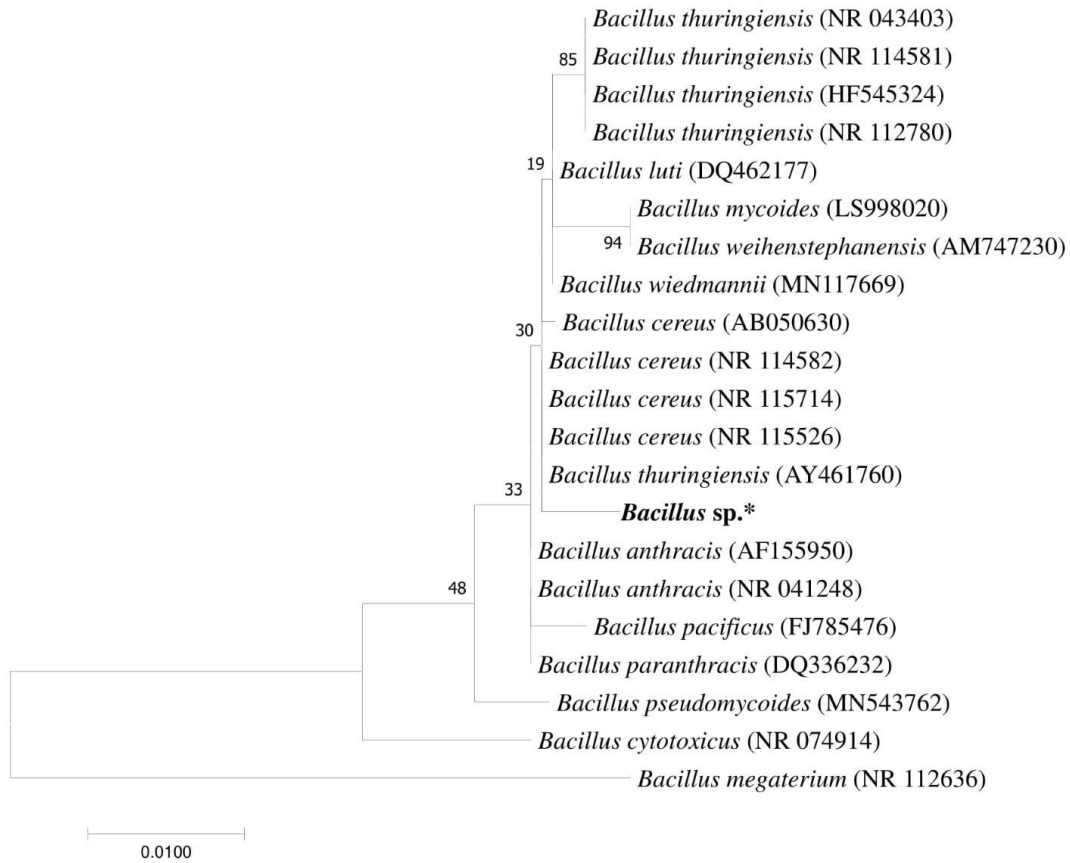


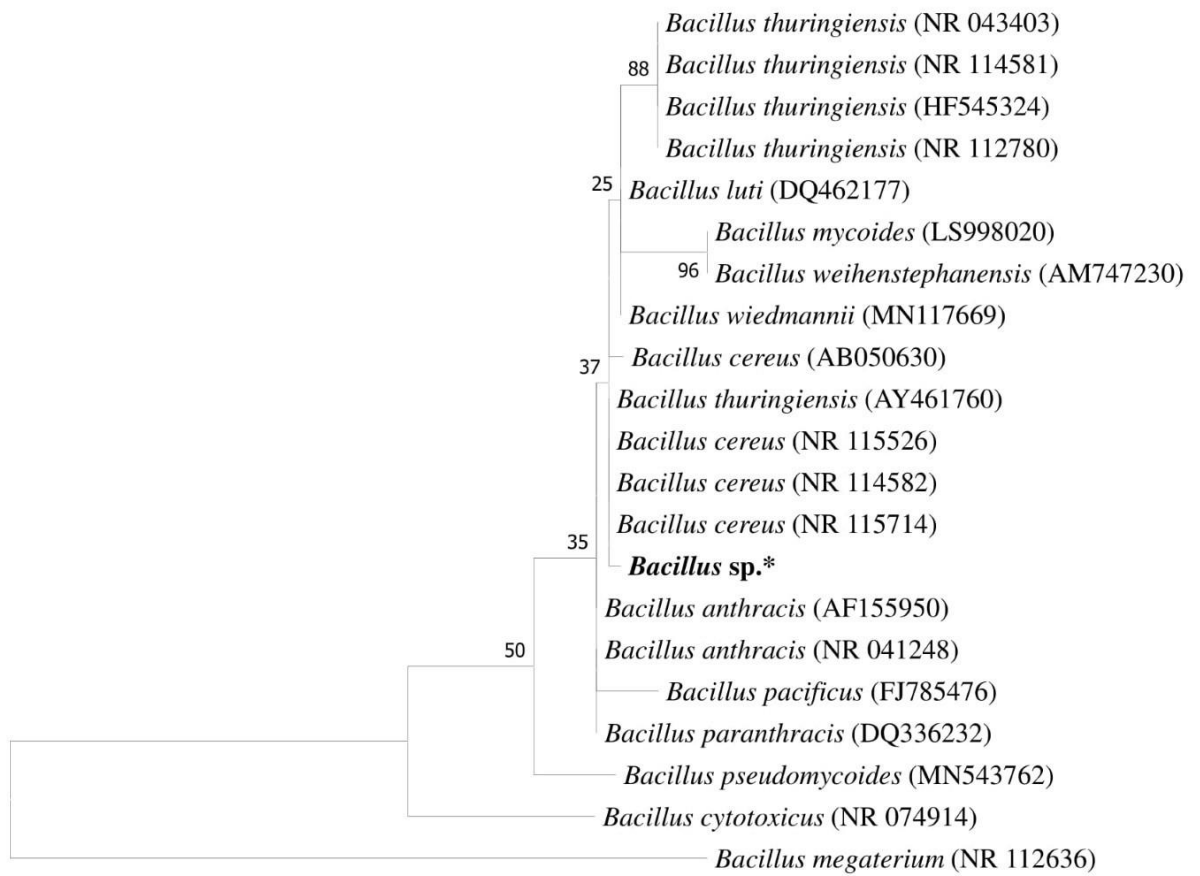
Árvore filogenética da espécie *Aeromonas hydrophila*

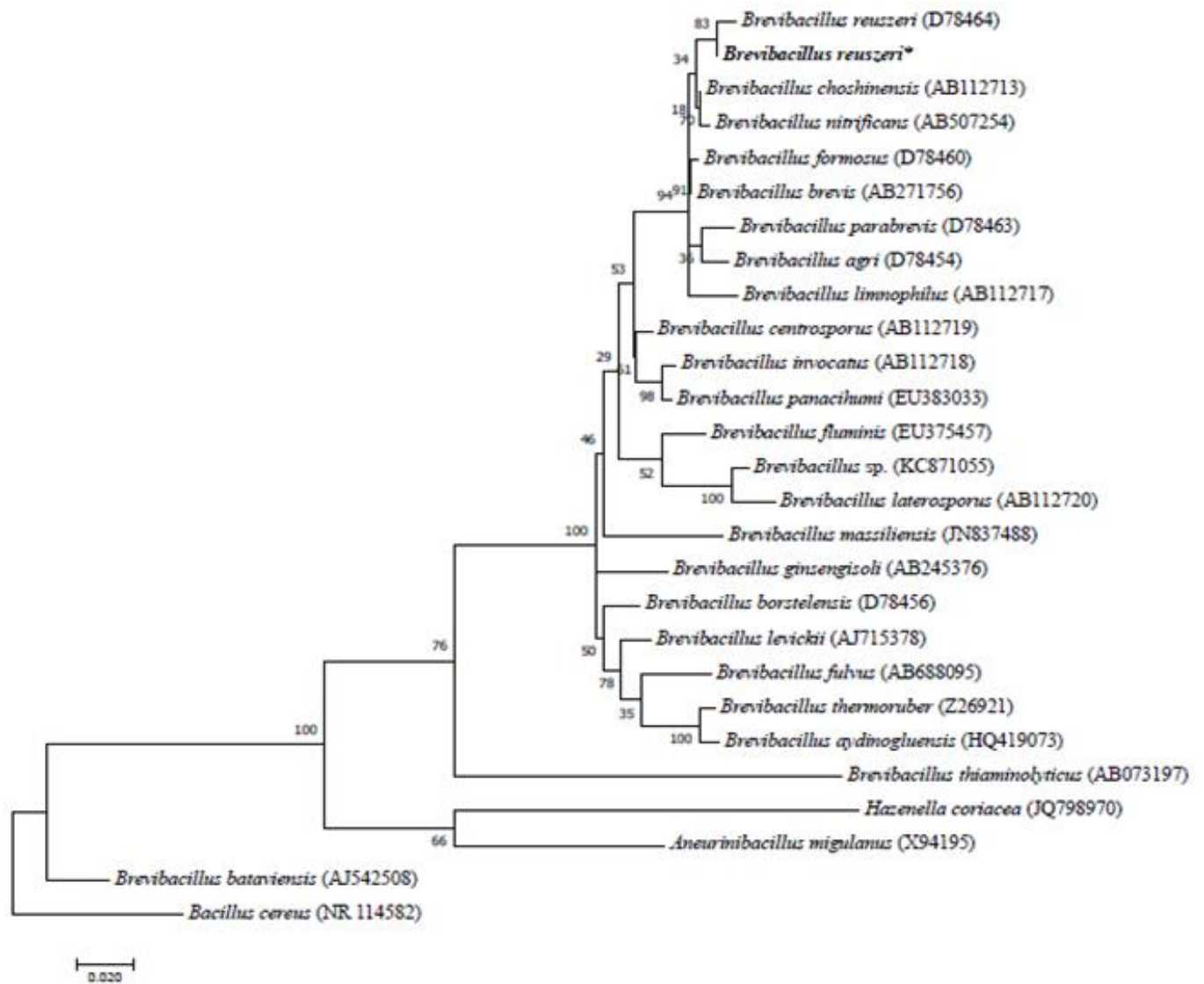


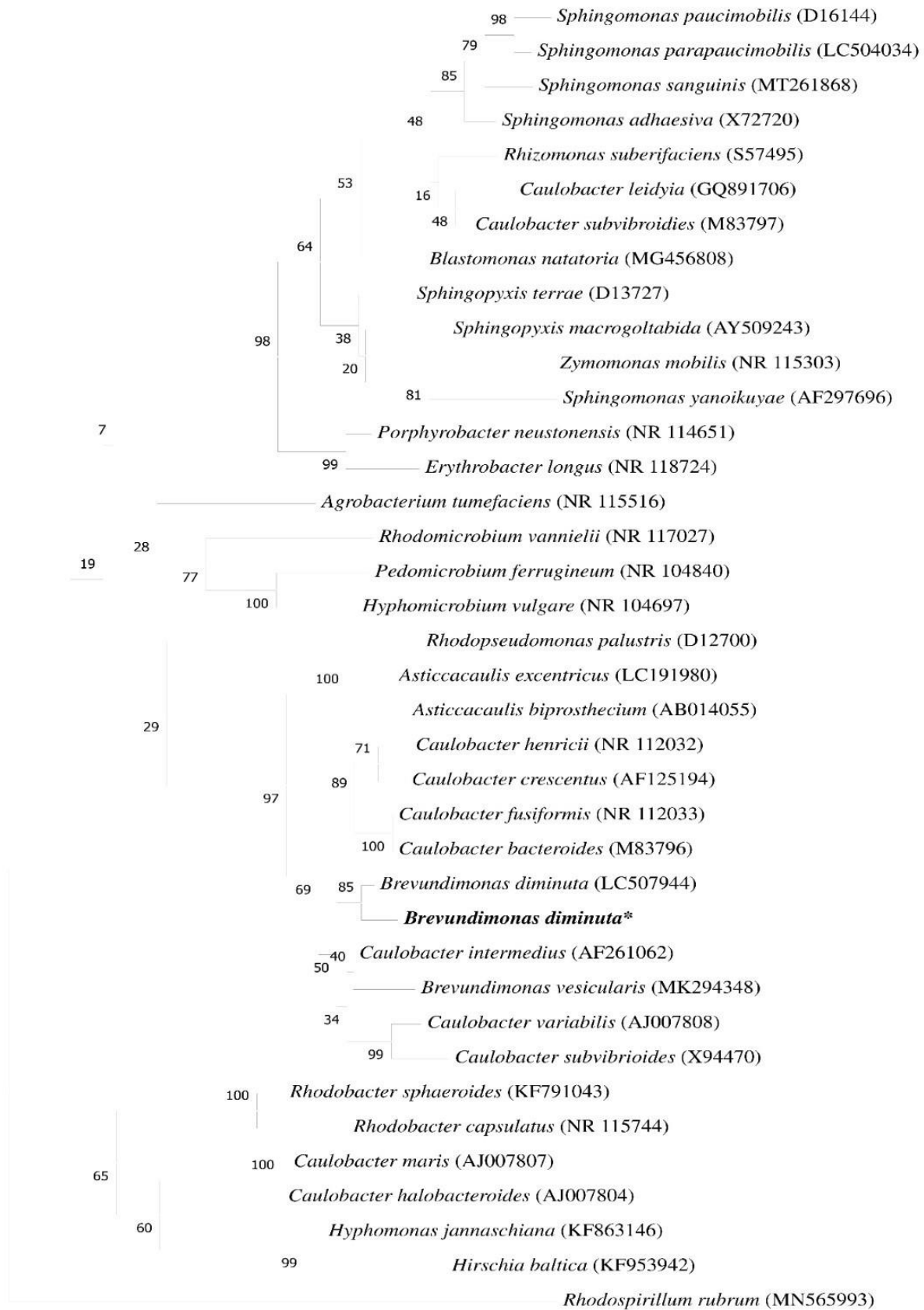
Árvore filogenética da espécie *Bacillus anthracis*

Árvore filogenética da espécie *Bacillus cereus*

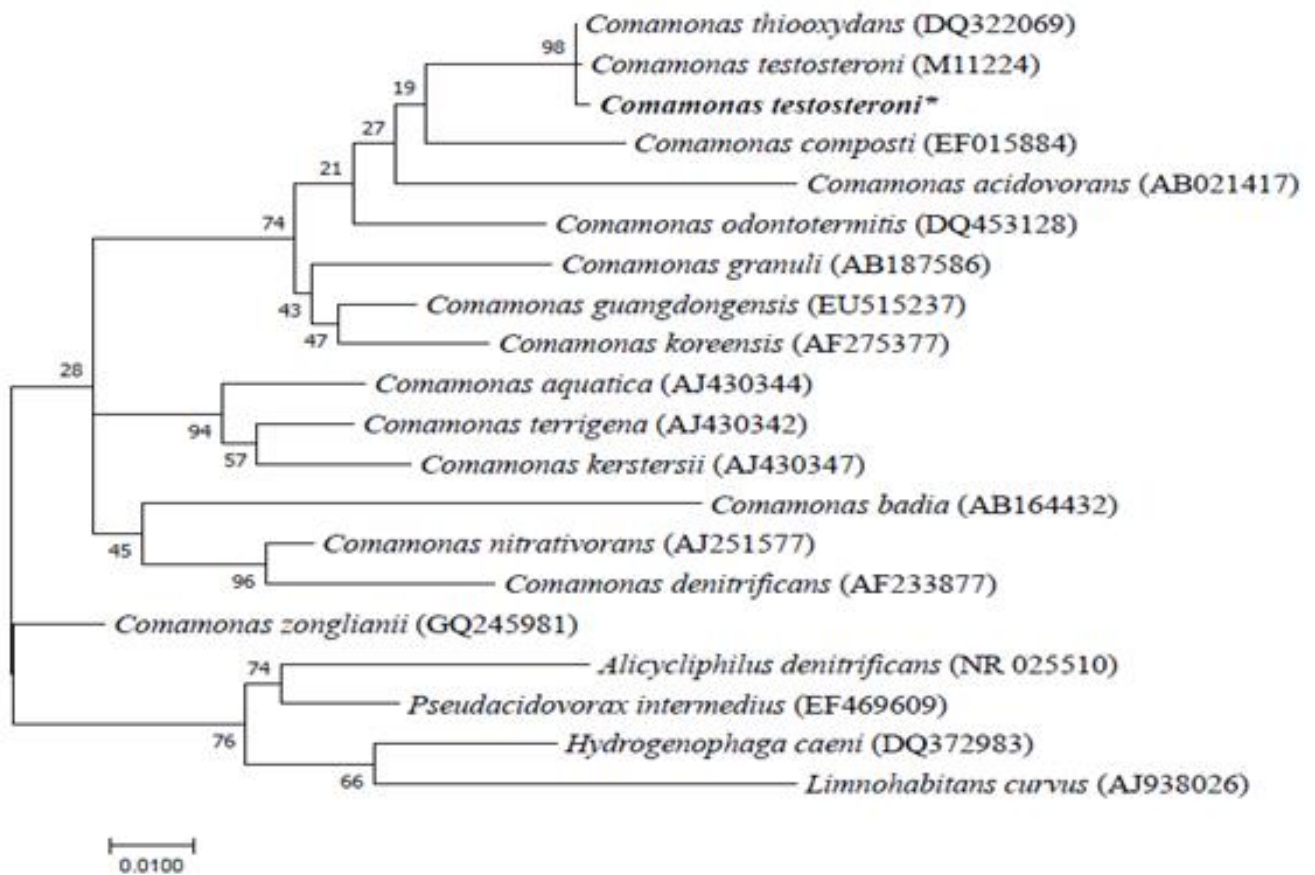


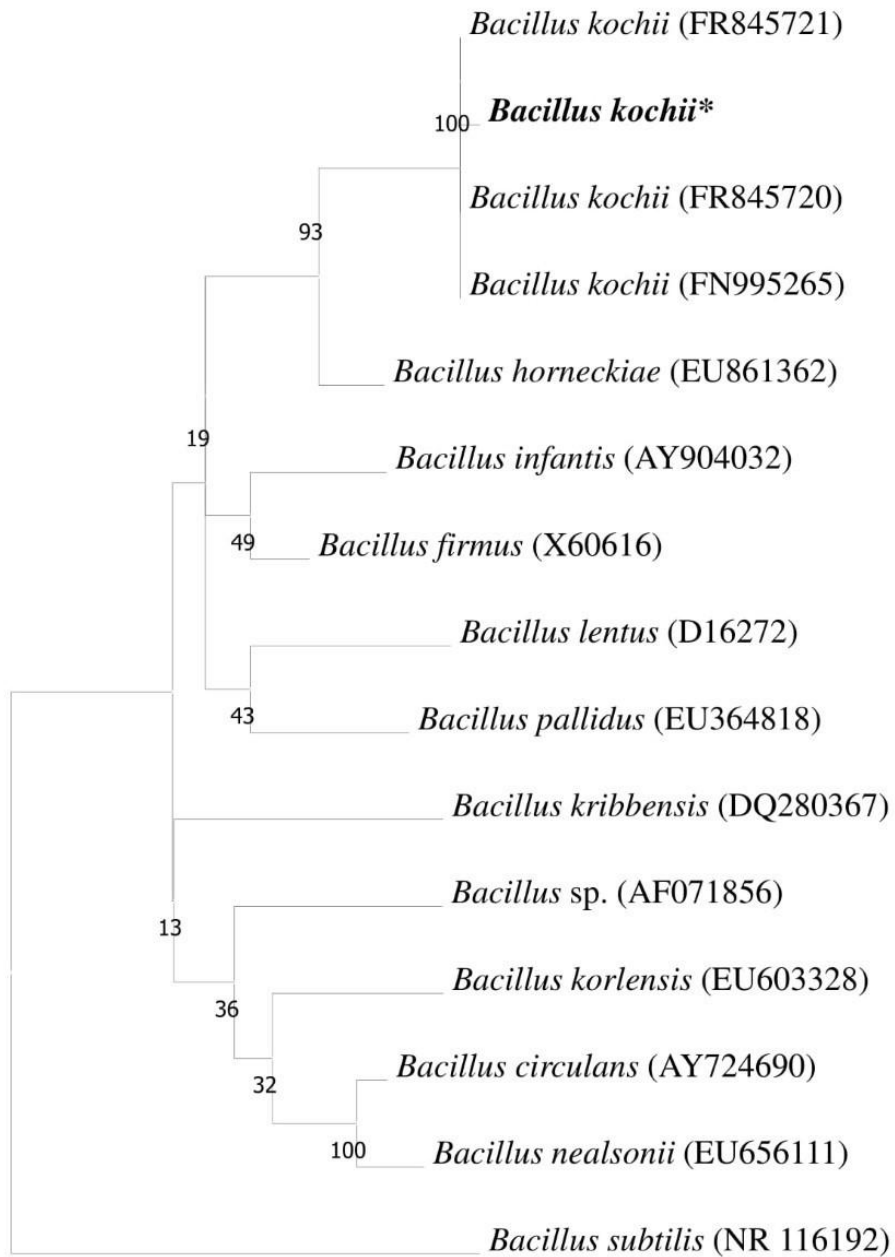
Árvore filogenética da espécie *Bacillus thuringiensis*

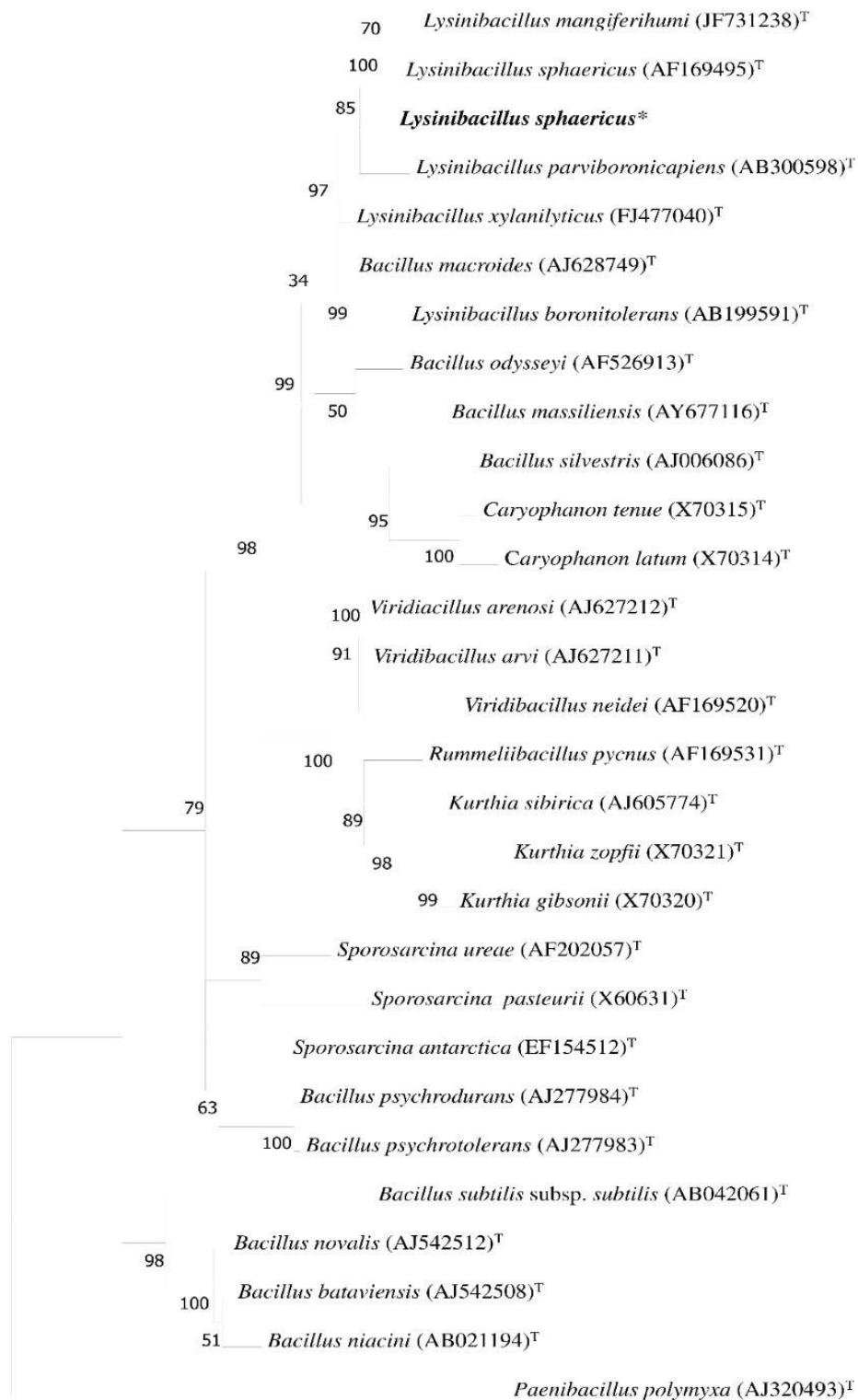
Árvore filogenética da espécie *Brevibacillus reuszeri*

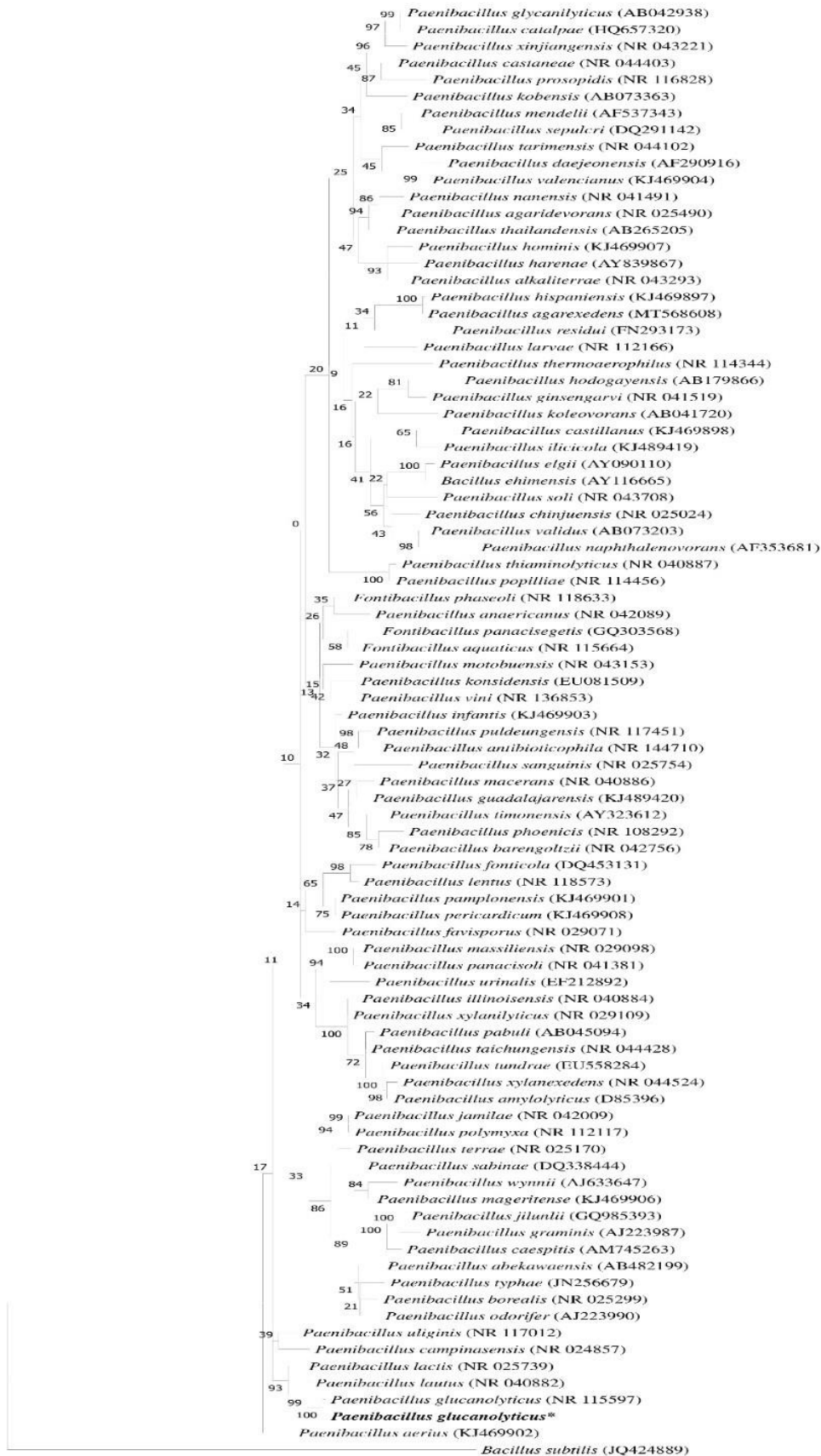
Árvore filogenética da espécie *Brevundimonas diminuta*

0.050

Árvore filogenética da espécie *Comamonas testosteroni*

Árvore filogenética da espécie *Bacillus kochii*

Árvore filogenética da espécie *Lysinibacillus sphaericus*

Árvore filogenética da espécie *Paenibacillus glucanolyticus*

0.10

Árvore filogenética da espécie *Sphingomonas koreensis*