

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

BIOSSORÇÃO DE SELÊNIO POR *Pseudomonas stutzeri* e *P. putida*

LUANA PRISCILA JUST

JOINVILLE

2019

LUANA PRISCILA JUST

BIOSSORÇÃO DE SELÊNIO POR *Pseudomonas stutzeri* e *P. putida*

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, na Universidade da Região de Joinville.

Orientador: Prof Dr. Ozair Souza.

Co-orientadora: Prof^a Dra. Andrea Lima dos Santos Schneider.

JOINVILLE

2019

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

J96b Just, Luana Priscila
Biossorção de selênio por *Pseudomonas stutzeri* e *P. putida* / Luana Priscila Just; orientador Dr. Ozair Souza, co-orientadora: Andrea Lima dos Santos Schneider. – Joinville: UNIVILLE, 2019.

84 p.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville)

1. Biossorção. 2. Resíduos industriais. 3. Selênio. 4. Tratamento biológico. 5. Pseudomonas. I. Souza, Ozair (orient.). II. Schneider, Andrea Lima dos Santos (co-orient.). III. Título.

CDD 628.43


Termo de Aprovação

“Biossorção de selênio por *Pseudomonas stutzeri* e *P. putida*”


por

Luana Priscila Just


Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos.



Prof. Dr. Ozair Souza
Orientador (UNIVILLE)

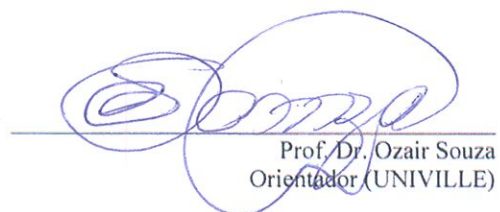


Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Coorientadora (UNIVILLE)



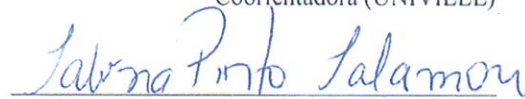
Prof. Dr. Ozair Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ozair Souza
Orientador (UNIVILLE)

Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Coorientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Sabrina Pinto Salamoni
(UNOESC)



Profa. Dra. Mariane Bonatti Chaves
(UNIVILLE)

Joinville, 31 de maio de 2019.

*“Não importa onde você parou. Em que momento da vida você cansou.
O que importa é que sempre é possível e necessário “Recomeçar”.
Recomeçar é dar uma chance a si mesmo. É renovar as esperanças na vida e o mais
importante... Acreditar em você de novo.[...]”*

(Carlos Drummond de Andrade)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1. Selênio	13
3.1.1. Propriedades físicas e químicas	13
3.1.2. Disponibilidade	16
3.1.3. Ciclo biogeoquímico	20
3.1.4. Fontes de selênio	22
3.1.5. Aplicações do selênio	23
3.2. Impactos ambientais provocados pelo selênio	24
3.3. Legislação ambiental	26
3.4. Toxicologia ambiental	27
3.5. Tecnologias de tratamento de efluentes contendo Se	28
3.5.1. Redução Química	29
3.5.2. Precipitação química	29
3.5.3. Adsorção	30
3.5.4. Tratamento biológico	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Ensaio de biossorção	35
4.1.1. Ativação das células	35
4.1.2. Inóculo para os ensaios de biossorção	36
4.1.3. Ensaio de biossorção com meio sintético	36
4.1.4. Caracterização do efluente industrial	38
4.1.4.1. Determinação de DQO	38
4.1.4.2. Determinação da DBO ₅	38
4.1.4.3. Determinação de pH e salinidade	39
4.1.5. Tratamento biológico do efluente industrial	39
4.1.6. Amostragem	41
4.1.7. Análise do crescimento celular	41

4.1.8.	Análise da concentração de glicose.....	42
4.1.9.	Análise da concentração de Se Total	42
4.1.10.	Parâmetros cinéticos	43
4.1.11.	Análise estatística.....	43
4.2.	Testes toxicológicos	44
4.2.1.	Cultivo dos organismos-teste.....	44
4.2.2.	Teste de sensibilidade dos organismos-teste	44
4.2.3.	Testes de toxicidade aguda	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1.	Tratamento biológico de meio sintético	46
5.1.1.	Ensaio com solução de selenito 30 mg/L	46
5.1.2.	Determinação da concentração máxima tolerada	50
5.2.	Tratamento biológico do efluente industrial.....	58
5.2.1.	Caracterização do efluente industrial	58
5.2.2.	Ensaio de biossorção com efluente industrial	59
5.3.	Testes de toxicidade aguda	71
6.	CONCLUSÕES	73
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
8.	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE A.....	82
	APÊNDICE B.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Pourbaix.	15
Figura 2 – Ciclo bioquímico do selênio: a) redução desassimilativa; b) redução assimilativa; c) alquilação; d) desalquilação; e) oxidação; f) precipitação bioinduzida; g) dismutação.	18
Figura 3 – Processos de disponibilização de espécies de selênio em meio aquático.....	20
Figura 4 – Ciclo biogeoquímico do selênio em ambientes aquático e terrestre.	21
Figura 5 – Locais com elevada contaminação de selênio.	25
Figura 6 – Processos biotecnológicos para redução de íons de selênio.	31
Figura 7 – Ensaio de cultivo de <i>P. stutzeri</i> e <i>P. putida</i> em meios sintéticos* com diferentes concentrações de selenito de sódio.....	37
Figura 8 - Ensaio de cultivo de <i>P. stutzeri</i> e <i>P. putida</i> em meio efluente industrial* com diferentes concentrações de selênio total.	40
Figura 9 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de <i>P. stutzeri</i>	46
Figura 10 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de <i>P. putida</i>	47
Figura 11 – Consumo de glicose nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de <i>P. stutzeri</i>	48
Figura 12 – Consumo de glicose nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de <i>P. putida</i>	48
Figura 13 – Coloração dos meios sintéticos nos ensaios M1, M2 e M3 nos tempos inicial (t_i) e final ($t_f = 27$ h) de cultivo de <i>P. stutzeri</i>	50
Figura 14 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M4 (50 mg/L de selenito), M5 (90 mg/L de selenito) e M6 (140 mg/L de selenito) de <i>P. stutzeri</i>	51
Figura 15 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M4 (50 mg/L de selenito), M5 (90 mg/L de selenito) e M6 (140 mg/L de selenito) de <i>P. putida</i>	52
Figura 16 – Coloração dos meios nos ensaios M7, M8 e M9 em 24 h e 48 h de cultivo de <i>P. stutzeri</i>	55
Figura 17 – Coloração dos meios nos ensaios M7, M8 e M9 em 24 h e 48 h de cultivo de <i>P. putida</i>	56
Figura 18 – Eficiência de biossorção de selênio (R) de <i>P. stutzeri</i> e <i>P. putida</i> cultivadas em meio sintético ($t_f = 24$ h) com diferentes concentrações iniciais de selenito (Se_i).	57
Figura 19 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M11 (30 mg/L de selenito), M12 (30 mg/L de selenito e glicose), M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) e M14 (30 mg/L de selenito e caldo nutriente) de <i>P. stutzeri</i>	59
Figura 20 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M11 (30 mg/L de selenito), M12 (30 mg/L de selenito e glicose), M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) e M14 (30 mg/L de selenito e caldo nutriente) de <i>P. putida</i>	60

Figura 21 – Consumo de glicose nos ensaios com efluente industrial M12 (30 mg/L de selenito e glicose) e M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) por <i>P. stutzeri</i> .	61
Figura 22 – Consumo de glicose nos ensaios com efluente industrial M12 (30 mg/L de selenito e glicose) e M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) por <i>P. putida</i> .	61
Figura 23 – Coloração dos meios nos ensaios M11, M12, M13 e M14 em 27 h de cultivo de <i>P. stutzeri</i> .	63
Figura 24 – Coloração dos meios nos ensaios M11, M12, M13 e M14 em 27 h de cultivo de <i>P. putida</i> .	63
Figura 25 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de <i>P. stutzeri</i> .	65
Figura 26 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de <i>P. putida</i> .	65
Figura 27 – Eficiência de biossorção (R) dos ensaios com efluente industrial M15, M16, M17 e M18 no cultivo de <i>P. stutzeri</i> e <i>P. putida</i> .	68
Figura 28 – Capacidade de biossorção (Y) dos ensaios com efluente industrial M15, M16, M17 e M18 no cultivo de <i>P. stutzeri</i> e <i>P. putida</i> .	69
Figura 29 – Coloração dos meios nos ensaios M15, M16, M17 e M18 em 48 h de cultivo de <i>P. stutzeri</i> .	70
Figura 30 – Coloração dos meios nos ensaios M15, M16, M17 e M18 em 48 h de cultivo de <i>P. putida</i> .	70
Figura 31 – Curva de calibração de concentração celular [X] em g/L de <i>P. stutzeri</i> .	82
Figura 32 – Curva de calibração de concentração celular [X] em g/L de <i>P. putida</i> .	82
Figura 33 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M1 e M3 de <i>P. stutzeri</i> .	83
Figura 34 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M1 e M3 de <i>P. putida</i> .	83
Figura 35 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M12 e M13 de <i>P. stutzeri</i> .	84
Figura 36 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M12 e M13 de <i>P. putida</i> .	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos de selênio e aplicações industriais.	24
Tabela 2 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios em meio sintético a 30 mg/L de selenito (M2 e M3) de <i>P. stutzeri</i> e <i>P. putida</i> . Tempo de cultivo (t_f) de 27 h.	49
Tabela 3 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios em meio sintético de selenito (M4, M5, M6) de <i>P. stutzeri</i> . Tempo de cultivo (t_f) de 27 h.	53
Tabela 4 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios em meio sintético de selenito (M4, M5, M6) de <i>P. putida</i> . Tempo de cultivo (t_f) de 27 h.	54
Tabela 5 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total e eficiência de bioissorção (R) em meio sintético de selenito (M7, M8, M9) de <i>P. stutzeri</i> . Tempos de cultivo (t_f) de 24 h e 48 h.	54
Tabela 6 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total e eficiência de bioissorção (R) em meio sintético de selenito (M7, M8, M9) de <i>P. putida</i> . Tempos de cultivo (t_f) de 24 h e 48 h.	56
Tabela 7 - Caracterização do efluente industrial (pH, salinidade, DBO ₅ e DQO) nas concentrações de 30 mg/L, 268 mg/L e 927 mg/L de selênio total.	58
Tabela 8 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial a 30 mg/L de selenito (M11, M12, M13 e M14) de <i>P. stutzeri</i>	62
Tabela 9 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial a 30 mg/L de selenito (M11, M12, M13 e M14) de <i>P. putida</i>	62
Tabela 10 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de <i>P. stutzeri</i>	66
Tabela 11 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de <i>P. putida</i>	67
Tabela 12 – Testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> em diferentes fatores de diluição (%) para os meios T1 e T2 (conforme M3) e T3 e T4 (conforme M13) tratados por <i>P. putida</i>	71

RESUMO

O selênio (Se) é um elemento químico muito importante industrialmente, utilizado na indústria eletrônica, na produção de vidro, em aditivos metalúrgicos, em refinarias de petróleo, minas de carvão e na agricultura. Devido a sua ampla utilização na indústria, grande quantidade de Se é descartada em ambientes aquáticos por meio de efluentes industriais contendo selenato (SeO_4^{2-}) ou selenito (SeO_3^{2-}). Essas espécies de Se apresentam alta toxicidade e capacidade de bioacumulação nos organismos. Conseqüentemente, há legislações que regulamentam a concentração máxima de lançamento de selênio total nos ambientes aquáticos e, com isso, o tratamento desses efluentes torna-se necessário para atendimento legal. Diversas tecnologias de tratamento podem ser empregadas para redução de selênio, sendo as principais: redução química, coprecipitação química e adsorção. Outra tecnologia que pode ser aplicada é a bioissorção por meio de micro-organismos capazes de reduzir formas mais tóxicas de selênio em selênio elementar (menos tóxico), constituindo assim um tratamento biológico do efluente industrial. A fim de contribuir com o estudo do tratamento biológico de efluentes industriais contendo selênio residual, foram avaliadas diferentes composições de meio de cultivo (podendo conter selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) e concentrações de selenito (30, 50, 90, 140, 500, 1000 e 1500 mg/L para meio sintético e 30, 268 e 927 mg/L para efluente industrial) nos ensaios de bioissorção pelas bactérias *Pseudomonas stutzeri* CCT 7544 (ATCC 31258) e *P. putida* KT2440. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer em condições anaeróbias, a 30 °C, 150 min⁻¹. Também foram realizados teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* em amostras sintéticas e de efluente tratadas e não-tratadas. Nos ensaios com meio sintético, percebeu-se que, com o aumento de selenito no meio de cultivo, *P. stutzeri* mostrou ser mais sensível que *P. putida* até concentrações de $\text{Se}_i = 140$ mg/L. Para $\text{Se}_i \geq 500$ mg/L, ambas as bactérias apresentaram drástica redução de eficiência na bioissorção (R), mesmo com capacidades de bioissorção (Y) semelhantes. De modo geral, os ensaios com as concentrações Se_i de 30, 50 e 90 mg/L obtiveram os melhores valores de R (> 85%) para ambas as bactérias. Nos ensaios com efluente industrial, avaliou-se a influência da competição de íons no meio de cultivo devido a presença de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Destaca-se a bactéria *P. putida* no ensaio com 268 mg/L de selenito e caldo nutriente, que obteve a maior eficiência e capacidade de bioissorção ($R = 38,85 \pm 10,35\%$ e $Y = 38,93 \pm 21,52$ mg/g) com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais ensaios. No entanto, nenhum dos resultados obtidos atenderam as concentrações máximas de selênio total permitidas para lançamento em corpos hídricos pelas legislações ambientais vigentes, o que também ocorreu para os ensaios de toxicidade aguda.

Palavras-chave: bioissorção de selênio, efluente industrial, *Pseudomonas*

ABSTRACT

Selenium (Se) is a very important chemical element industrially used in the electronics industry, glass production, metallurgical additives, petroleum refineries, coal mines and agriculture. Due to its wide use in the industry, large quantities of Se are discharged into aquatic environments through industrial effluents containing selenate (SeO_4^{2-}) or selenite (SeO_3^{2-}). These species exhibit high toxicity and bioaccumulation capacity in organisms. Consequently, there are laws that regulate the maximum concentration of total selenium release in aquatic environments and, therefore, the treatment of these effluents becomes necessary for legal assistance. Several treatment technologies can be used to reduce selenium, the main ones being: chemical reduction, chemical coprecipitation and adsorption. Another technology that can be applied is biosorption by means of microorganisms capable of reducing more toxic forms of selenium in elemental selenium (less toxic), thus constituting a biological treatment of the industrial effluent. In order to contribute to the study of the biological treatment of industrial wastewaters containing residual selenium, different compositions of culture medium (containing sodium selenite, glucose and nutrient broth) and concentrations of selenite (30, 50, 90, 140, 500, 1000 and 1500 mg/L for synthetic medium and 30, 268 and 927 mg/L for industrial effluent) in the biosorption assays by bacteria *Pseudomonas stutzeri* CCT 7544 (ATCC 31258) and *P. putida* KT2440. The experiments were conducted in Erlenmeyer flasks under anaerobic conditions at 30 °C, 150 min⁻¹. Acute toxicity testing with *Daphnia magna* was also performed on treated and untreated synthetic and effluent samples. In the synthetic medium assays, it was observed that, with the increase of selenite in the culture medium, *P. stutzeri* showed to be more sensitive than *P. putida* to concentrations of $\text{Se}_i = 140$ mg/L. For $\text{Se}_i \geq 500$ mg/L, both bacteria showed drastic reduction in biosorption efficiency (R), even with similar biosorption capacities (Y). In general, the assays with the Se_i concentrations of 30, 50 and 90 mg/L obtained the best values of R (> 85%) for both bacteria. In the industrial effluent tests, the influence of ion competition on the culture medium was evaluated due to the presence of sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). The bacterium *P. putida* was evaluated in the 268 mg/L selenite and nutrient broth, which obtained the highest efficiency and biosorption capacity (R = 38.85 ± 10.35% and Y = 38.93 ± 21.52 mg/g) with significant difference (p < 0.05) in relation to the other assays. However, none of the results obtained met the maximum concentrations of total selenium allowed for release into water bodies by current environmental legislation, which also occurred for the acute toxicity tests.

Key-words: selenium biosorption, wastewater, *Pseudomonas*

1. INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento essencial ao ser humano e outros organismos em baixas concentrações, porém se torna tóxico em níveis elevados (MISHRA *et al.*, 2011).

As fontes de selênio podem ser tanto naturais, sendo encontrado em vulcões e em vários tipos de rochas ígneas e sedimentares (TAN *et al.*, 2016), quanto antropogênicas, proveniente das atividades industriais que demandam grande quantidade de selênio, o qual se constitui um elemento valioso amplamente utilizado em eletrônica, fabricação de vidro, pigmentos e aditivos metalúrgicos (TSUBASA *et al.*, 2013). Além disso, esse elemento se constitui em um dos principais subprodutos em refinarias de metal e de processamento da produção de ácido sulfúrico (NANCHARIAH & LENS, 2015). Outras atividades incluem as indústrias de mineração, de petróleo e de utilização de fosfatos rochosos como fertilizantes (TAN *et al.*, 2016; MISHRA *et al.* 2011).

O consumo mundial de selênio foi estimado em 40% para a metalurgia, 25% na fabricação de vidro, 10% para a agricultura, 10% na fabricação de produtos químicos e pigmentos, 10% para a eletrônica e 5% para outras aplicações. Em relação à produção de selênio, os principais países produtores são Japão, Canadá, Bélgica e Alemanha, com uma produção global anual estimada em cerca de 2.500 à 2.800 toneladas (TAN *et al.*, 2016).

À medida que o consumo de selênio aumenta, uma grande quantidade desse elemento, nas duas diferentes formas de oxidação, é lançada em ambientes aquáticos por meio de efluentes industriais, os quais conferem toxicidade e podem ocasionar graves impactos ambientais. No ambiente, esse elemento ocorre na forma elementar (Se^0), insolúvel em água, ou em diferentes estados de oxidação, como na forma reduzida (seleneto, Se^{-2}) ou nas formas oxidadas como o selenito (SeO_3^{-2}) e selenato (SeO_4^{-2}), solúveis em água (MISHRA *et al.*, 2011).

Como os íons SeO_3^{-2} e SeO_4^{-2} conferem toxicidade ao meio ambiente, há legislações que regulamentam a concentração máxima de lançamento de selênio presente em efluentes industriais. No âmbito federal, a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011) estabelece os padrões de lançamento de efluentes e o limite máximo permitido do parâmetro Selênio Total é de $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$.

Em relação à legislação de Santa Catarina, Lei Estadual nº 14.675 de 13 de abril de 2009 (BRASIL, 2009), a qual constitui o Código Estadual do Meio Ambiente, estabelece como limite máximo permitido de 0,02 mg.L⁻¹ de Selênio Total.

Dessa forma, se torna necessário o tratamento de efluentes que contenham selênio antes do lançamento em corpos hídricos. De acordo com Kuroda *et al.* (2011), as principais tecnologias de tratamento baseiam-se na co-precipitação química ou na adsorção; contudo, a remoção química e/ou física é considerada ineficiente e bastante onerosa para uso prático, representando um sério problema para as indústrias.

Outra tecnologia que pode ser aplicada é a redução de selenito ou selenato em selênio elementar (menos tóxico) por processos envolvendo micro-organismos (MISHRA *et al.*, 2011).

Diversas bactérias capazes de realizar reações de redução do selênio foram isoladas e, algumas delas, foram amplamente caracterizadas para o desenvolvimento de estratégias eficientes para a biorremediação de ambientes aquáticos contaminados com selênio solúvel (IKE *et al.*, 2000). Um dos micro-organismos mais conhecidos por reduzir selênio enzimaticamente é *Pseudomonas stutzeri* (LLOYD, 2003; TSUBASA *et al.*, 2013).

A fim de contribuir com o estudo do tratamento biológico de efluentes industriais contendo selênio residual, foi coletado efluente de uma indústria química de Joinville/SC contendo selenito (SeO₃⁻²) residual, antes e após o seu tratamento na Estação de Tratamento de Efluente da empresa; e desenvolvido o presente trabalho. Foi realizado o tratamento biológico com as bactérias *Pseudomonas stutzeri* e *Pseudomonas putida*, estabelecido a cinética de bioadsorção do contaminante e realizado os ensaios toxicológicos das diferentes misturas avaliadas contendo selenito (mistura sintética e efluente industrial).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de bio sorção de selênio (Se) por duas linhagens de *Pseudomonas* empregando cultivo em meio sintético e em meio contendo efluente industrial.

2.2. Objetivos Específicos

Estabelecer a cinética de crescimento sem aeração microbiano, consumo de substrato, eficiência e capacidade de bio sorção de Se em meios de cultivo sintético com diferentes composições e indicar a(s) melhor(es) composição(ões) de cultivo para *P. stutzeri* e *P. putida* visando o tratamento biológico de efluente industrial.

Caracterizar o efluente coletado em indústria química da região de Joinville, conforme permitido pela empresa: DQO, DBO₅, pH, salinidade e concentração de selênio total.

Estabelecer a cinética de crescimento anaeróbio microbiano, consumo de substrato, eficiência e capacidade de bio sorção de Se em meios de cultivo com diferentes composições e concentrações de selênio total do efluente industrial para *P. stutzeri* e *P. putida*.

Indicar a linhagem de *Pseudomonas* de maior potencialidade para uso no tratamento de efluente industrial contendo selênio residual de maneira a atender a legislação ambiental vigente.

Realizar testes toxicológicos com *Daphnia magna* dos meios de cultura sintético e efluente industrial, antes e após o tratamento biológico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Selênio

3.1.1. Propriedades físicas e químicas

O selênio é classificado como não-metal, um elemento metalóide, pertencente ao grupo 16 da tabela periódica. É um elemento que pode estar presente no planeta nas fases sólida, líquida ou gasosa (ALMEIDA, 2014).

Esse elemento apresenta cinco isótopos estáveis existentes (^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se e ^{80}Se) e um isótopo proveniente da cisão do $^{235}\text{Urânio}$ (^{79}Se) recebendo atenção especial devido ao crescente interesse na pesquisa de descarte de resíduos nucleares (ALMEIDA, 2014; TAN *et al.*, 2016).

De acordo com König *et al.* (2012), o elemento selênio compartilha muitas propriedades físicas semelhantes ao arsênio e comportamento químico ao do enxofre, possuindo propriedades chalcófilas (forte afinidade com enxofre), e siderófilas (capazes de formar uma ligação metálica com ferro).

Uma vez que o selênio exibe propriedades semelhantes aos de metais pesados, pode existir em diferentes estados de oxidação: selenato (Se^{+6} , SeO_4^{-2}); selenito (Se^{+4} , SeO_3^{-2}); selênio elementar (Se^0); selenetos orgânicos e inorgânicos (Se^{-2}). Além disso, algumas das substâncias que contêm selênio podem ser voláteis (NAKAMARU *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2014; ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Os diferentes estados de oxidação do selênio influenciam diferentemente na atividade biológica e nas propriedades físico-químicas. Geralmente, o selênio presente em substâncias ou compostos se apresenta na forma solúvel e oxida facilmente para formar íons (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Os íons selenato e selenito são as espécies predominantes presentes na água, embora quantidades significativas de compostos de selênio orgânicos dissolvidos (Se^{-2} ou Se(III)) também possam estar presentes na água devido à atividade biológica (PONTON & HARE, 2013).

Dessa forma, pesquisadores estão dedicados no estudo de espécies inorgânicas predominantes de selenito (SeO_3^{2-} ou Se (IV)) e selenato (SeO_4^{2-} ou Se (VI)), as quais apresentam toxicidade ao meio ambiente (AWUAL *et al.*, 2014).

As espécies de selênio inorgânico são frequentemente encontradas em águas superficiais e subterrâneas. Já os compostos orgânicos de selênio prevalecem no ar, no solo e nas plantas na forma de metilselenetos voláteis, íons de trimetilselênio ou em aminoácidos (TAN *et al.*, 2016).

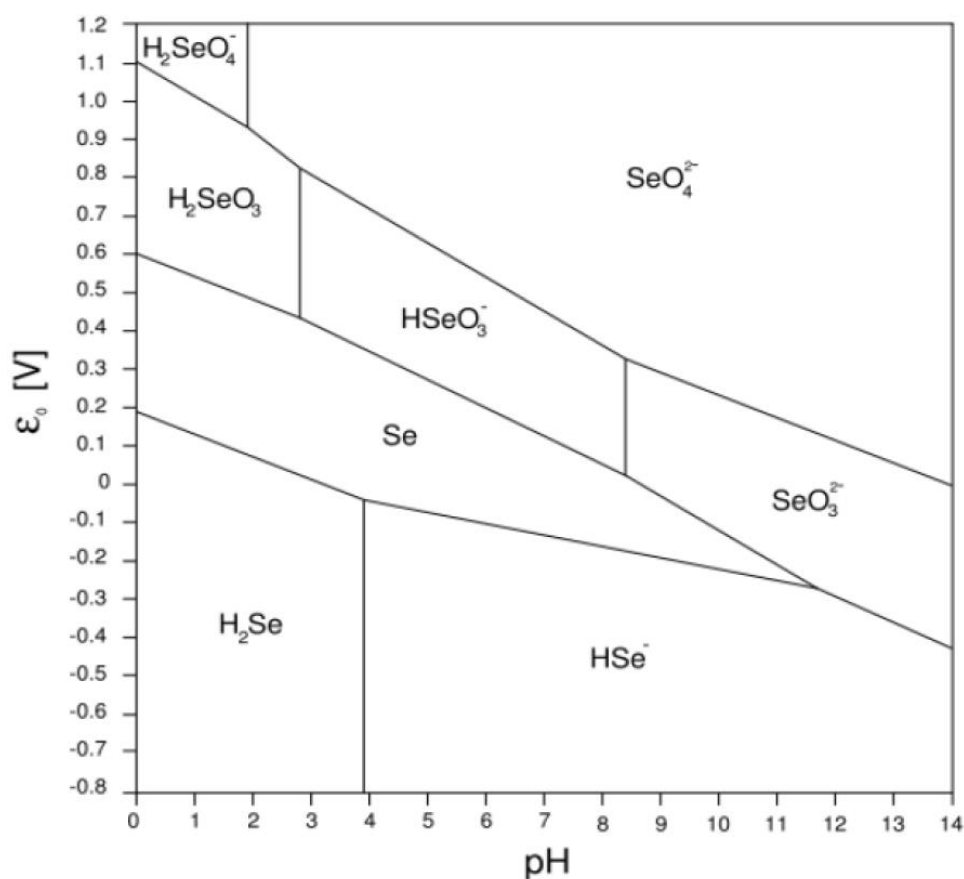
O selenito está presente em ambientes de pH moderadamente oxidativo e neutro. Além disso, o íon selenito é mais tóxico e móvel na água do que o íon selenato, que só existe em pH elevado e em condições oxidativas (DORRAJI & AMANI-GHADIM, 2016).

Na faixa de pH entre 6 e 8, apenas o selênio elementar, o selenito e o selenato estão presentes na água. Nesses valores de pH, os íons selenato e selenito são as formas predominantes de selênio dissolvido em água doce bem oxigenada. Em valores de pH <7 e sob condições levemente redutoras, as espécies de selenito são reduzidas ao selênio elementar (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Considerando o pH do ambiente aquático, a adsorção de selenito e selenato ao sedimento se torna menos eficiente com o aumento do pH. Além disso, o aumento do pH leva à precipitação de minerais de hidróxido de ferro e manganês, o que resulta na precipitação de selênio adsorvido (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Considerando os diferentes estados de oxidação e o pH de sistemas aquosos, as espécies de selênio termodinamicamente estáveis em função do pH e do potencial de oxidação-redução (ORP) são apresentadas no diagrama de Pourbaix da Figura 1 (ALMEIDA, 2014).

Figura 1 - Diagrama de Pourbaix.



Fonte: Almeida (2014).

No entanto, em um ambiente natural, este diagrama pode não traduzir a especiação do selênio, devido à instabilidade termodinâmica das especiações. Além disso, nem sempre a especiação do selênio pode ser determinada unicamente pelo ORP e pH (ALMEIDA, 2014).

Assim como nos sedimentos aquáticos, o comportamento do selênio nos solos é afetado por condições redox, pH, teor de hidróxido de ferro, teor de argila, materiais orgânicos e presença de íons concorrentes (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

3.1.2. Disponibilidade

O selênio existe principalmente como selenito inorgânico e selenito ou seleneto orgânicos em águas naturais (ADIO *et al.*, 2017; DORRAJI & AMANI-GHADIM, 2016).

Como elemento químico, constitui um micronutriente essencial que pode ser incorporado em proteínas e aminoácidos e outros intermediários bioquímicos de animais e seres humanos (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015). Entretanto, o nível de selênio deve ser considerado porque, embora seja um nutriente essencial em baixas concentrações, é tóxico em concentrações mais elevadas. Dependendo da especiação e do nível de dose, o selênio pode ser tóxico e potencialmente carcinogênico (AWUAL *et al.*, 2014).

A oxidação do selênio não ocorre apenas pela presença de oxigênio dissolvido no ambiente aquático, visto que esta condição não é suficiente para transformar, por exemplo, selenito em selenato. Nesse caso, a oxidação do selenito é reforçada por fatores, como metais de transição redox-ativos (ferro e manganês), que favorecem a abundância de oxidantes fortes na água, e também a presença de bactérias oxidantes de selenito (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

O selenato forma minerais solúveis e possui alta mobilidade geoquímica em águas oxidadas. Já os sais de selenito tendem a ser mais biodisponíveis devido à sua tendência de se adsorver ao material biológico. Em ecossistemas lênticos, como lagos ou zonas úmidas, onde o fluxo de água é baixo, o selenito predomina devido às transformações microbianas do selenato, ao potencial redox mais baixo e à vegetação abundante (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

O selenito pode precipitar em contato com os compostos férricos e pode aderir, através de adsorção, em superfícies de sedimentos ricos em ferro ou manganês. Além disso, certas bactérias encontradas em sedimentos podem remover o selênio da água através da redução por via respiratória, utilizando selenito e selenato como receptor de elétrons terminal na respiração. A redução abiótica do selenito ao selênio elementar na presença de óxidos de ferro ocorre geralmente nos sedimentos dos lagos. Muitos organismos microbianos reduzem o selenato e selenito como um mecanismo de tolerância, para espécies de selênio

mais reduzidas, como o selênio elementar e compostos de seleneto (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Já a absorção do selenato e selenito pode ser realizada por micro-organismos, algas e plantas (produtores primários), convertendo os íons em compostos orgânicos contendo selênio, que constitui a base para a qual o selênio entra na cadeia alimentar aquática. Compostos como selenocisteína e selenometionina são formados por plantas e algas (YANG *et al.* 2011). Dessa forma, o selênio é absorvido pelos organismos aquáticos por meio do contato com a água, sedimentos ou via dieta.

As características ambientais como pH, temperatura e espécie, podem afetar a absorção de compostos de selênio pelos produtores primários (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Como em águas superficiais é comum encontrar as espécies mais oxidadas do selênio (selenato e selenito) sob a forma solúvel, apresentando toxicidade elevada, possuem elevado potencial de biodisponibilidade e de bioacumulação (ALMEIDA, 2014).

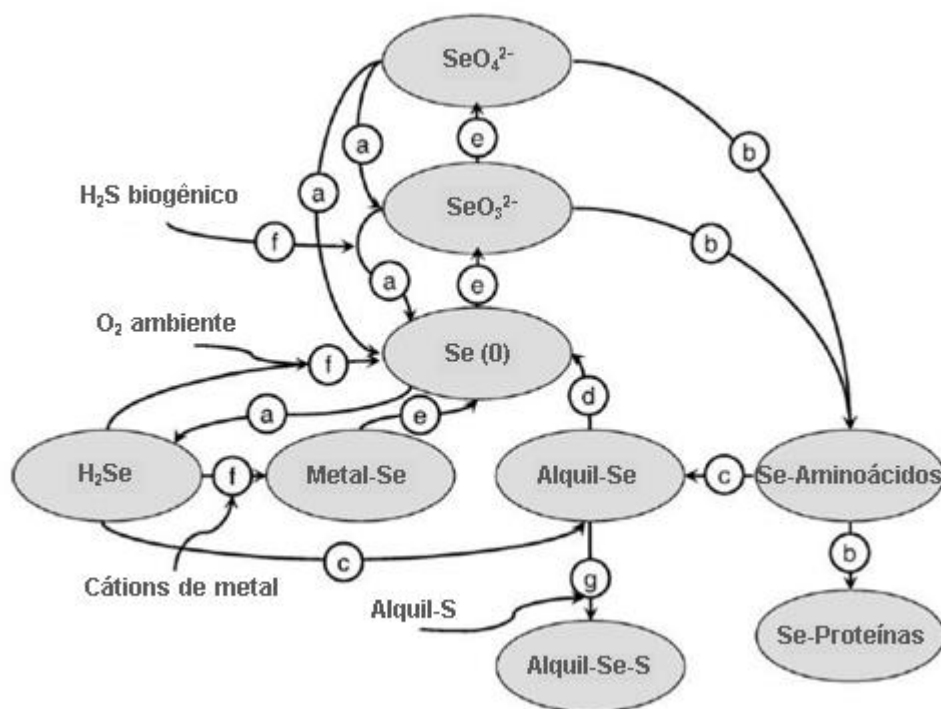
Em relação aos compostos orgânicos contendo selênio, estes podem sofrer foto-oxidação em água e sua mineralização eventualmente produz espécies de selênio inorgânico (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Já o selênio elementar (Se^0) é uma espécie que se encontra em estado sólido e se forma em ambientes redutores, sendo menos tóxico e menos biodisponível que outras espécies. No entanto, pode ser assimilado por bivalves quando encontrado nos sedimentos (ALMEIDA, 2014). É frequentemente encontrado em partículas suspensas na água, podendo ocorrer a sedimentação do mesmo no caso de sistemas aquáticos lênticos (YANG *et al.* 2011).

Além do selênio elementar, outras espécies que se formam em ambientes muito redutores compreendem os selenetos inorgânicos metálicos, compostos orgânicos e compostos de elevada toxicidade, como o gás seleneto (H_2Se) volátil (ALMEIDA, 2014). No entanto, o gás é espontaneamente oxidado em Se elementar (não tóxico) na presença de ar atmosférico (IKE *et al.*, 2000; RIZZO *et al.*, 2007).

Em resumo, as diferentes espécies de selênio podem ser transformadas a partir de reações de redução assimilativa e desassimilativa, alquilação, desalquilação, oxidação, precipitação e desmutação, caracterizando o ciclo bioquímico do selênio e, com isso, suas formas disponíveis no meio (Figura 2).

Figura 2 – Ciclo bioquímico do selênio: a) redução desassimilativa; b) redução assimilativa; c) alquilação; d) desalquilação; e) oxidação; f) precipitação bioinduzida; g) dismutação.



Fonte: adaptado de ALMEIDA (2014).

Como observado na Figura 2, a redução desassimilativa é a redução das formas oxidadas em selênio elementar e gás seleneto; enquanto que a redução assimilativa representa a incorporação do selênio das formas oxidadas em aminoácidos, ou seja, a assimilação das formas solúveis pelos organismos.

Já a alquilação e a desalquilação correspondem a associação e desassociação do grupo metila, respectivamente. De acordo com Almeida (2014), a principal contribuição para a alquilação do selênio ocorre por via biológica (micro-organismos, plantas e animais) podendo também ser mediada por reações fotoquímicas abióticas. Exemplos de formas de espécies de selênio alquiladas por reação biológica são o dimetilseleneto e o dimetildiseleneto.

De acordo com a Figura 2, a oxidação pode ocorrer sequencialmente do selênio associado à íons metálicos em selênio elementar, selenito e selenato.

Para ocorrer o processo de precipitação bioinduzida, fatores externos ao ciclo bioquímico são necessários, como sulfeto de hidrogênio biogênico, oxigênio dissolvido e íons metálicos, transformando-se na forma de selênio elementar.

Quanto à dismutação, esta ocorre somente na associação de grupo alquila sulfurado (composto contendo enxofre) em selênio alquilado.

Seixas & Kehrig (2007) apresentam quatro processos envolvendo oxidação e metilação, nos quais o selênio torna-se biodisponível em ambientes aquáticos, que são descritos a seguir.

O primeiro processo ocorre por meio das raízes das plantas aquáticas e dos micro-organismos bentônicos que realizam a oxidação das formas imobilizadas, convertendo-as em formas solúveis (selenito e selenato). Posteriormente, realizam a metilação, convertendo o selênio inorgânico em formas orgânicas que contêm um ou mais radicais metil que, geralmente, resultam em forma volátil.

O segundo processo é a oxidação do selênio encontrado no sedimento, denominado de bioturbação, o qual é realizado pelos invertebrados bentônicos.

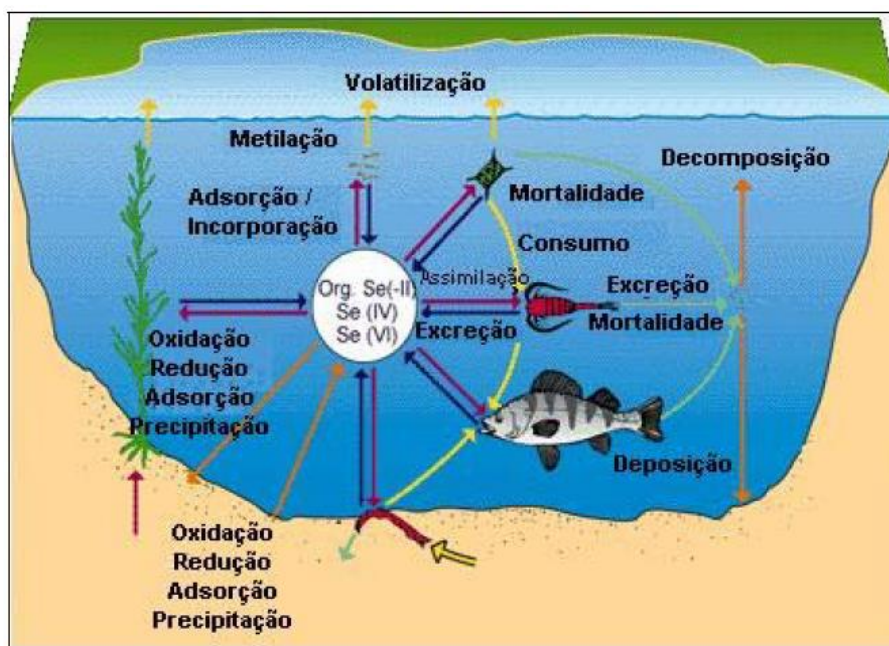
O terceiro processo ocorre por meios abióticos, como pela perturbação física e oxidação química, associadas à circulação da água.

No quarto processo, o selênio contido nos sedimentos pode ser oxidado pelas plantas e organismos fotossintéticos. Com isso, o selênio entra na cadeia alimentar nos sistemas aquáticos por meio de seus primeiros níveis tróficos e, então, é distribuído e acumulado através dos níveis tróficos subsequentes, podendo sofrer os processos de bioconcentração e bioacumulação.

O processo de bioconcentração é definido como a incorporação do composto por um organismo diretamente do ambiente abiótico; enquanto que o processo de bioacumulação é definido como a incorporação do composto pelo organismo tanto do meio abiótico quanto biótico, ou seja, pelo alimento (SEIXAS & KEHRIG, 2007).

Os processos que garantem a disponibilidade do selênio no ambiente aquático podem ser observados na Figura 3.

Figura 3 – Processos de disponibilização de espécies de selênio em meio aquático.



Fonte: Seixas & Kehrig (2007).

3.1.3. Ciclo biogeoquímico

Selênio é liberado para o ambiente a partir de fontes naturais e antropogênicas.

A inserção do selênio no solo ocorre por meio de deposição úmida e seca, resultante de emissões naturais e antropogênicas, escoamento superficial e alteração do solo (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

A partir do ciclo biogeoquímico, o selênio se move de rochas e sedimentos para as águas, onde se acumula em plantas e em animais ou seres humanos através da cadeia alimentar, que torna-se completo através da atividade metabólica dos organismos, permitindo a incorporação de selênio nos sedimentos e nos depósitos de rocha novamente (TAN *et al.*, 2016).

Como o selênio é um micronutriente essencial, a maioria dos organismos acumula, metaboliza, transforma e excreta selênio, que resulta em sua especiação complexa (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

As emissões de selênio para a atmosfera podem ocorrer por processos naturais, como por intemperismo e lixiviação do solo (WINKEL *et al.*, 2015), bem

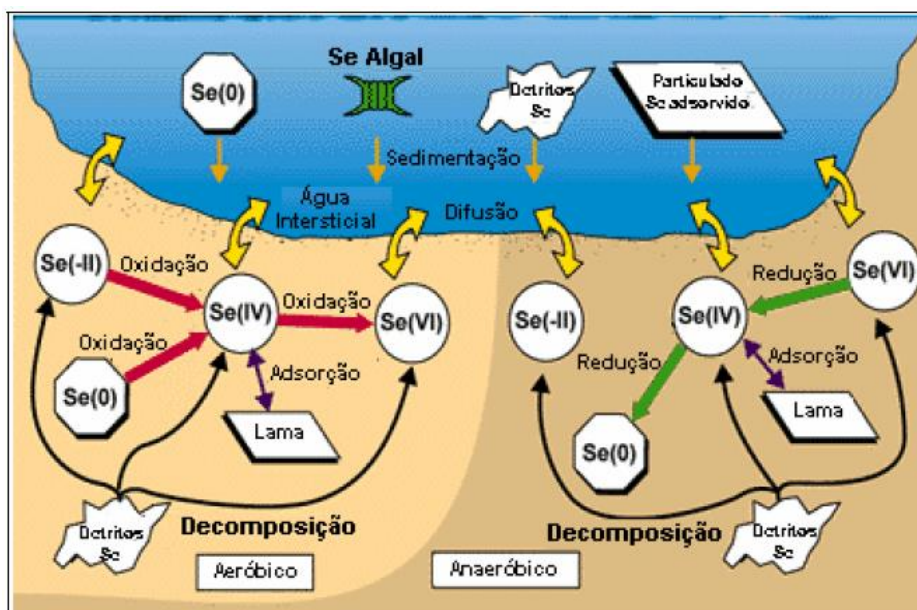
como pelas atividades humanas por meio de indústrias e queima de combustíveis fósseis (WINKEL *et al.*, 2012).

O selênio emitido para a atmosfera a partir de processos de combustão natural e industrial é geralmente assumido como sendo dióxido de selênio gasoso e selênio elementar adsorvido a partículas flutuantes no ar. O dióxido de selênio pode ser liberado no ar a partir da combustão de combustíveis fósseis e, pode então, ser transportado em distâncias variadas, afetando os ecossistemas terrestres e aquáticos quando se deposita. Um mecanismo comum pelo qual o selênio elementar e os compostos inorgânicos de selênio são volatilizados para a atmosfera é a biotransformação do organo-selênio em espécies voláteis de selênio, principalmente o dimetil seleneto ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$) e o disseleneto de dimetila ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$) (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Devido a semelhança química com o enxofre, o ciclo biogeoquímico do selênio no meio aquático é análogo ao ciclo do enxofre. O selênio, em meio aquático, pode ser absorvido ou ingerido pelos organismos, pode aderir ao material particulado ou à superfície do sedimento ou permanecer livre em solução (SEIXAS & KEHRIG, 2007).

As interações dos processos relacionados ao ciclo biogeoquímico nos ambientes aquático e terrestre são apresentadas na Figura 4.

Figura 4 – Ciclo biogeoquímico do selênio em ambientes aquático e terrestre.



Fonte: Seixas & Kehrig (2007).

3.1.4. Fontes de selênio

O selênio é um elemento que ocorre naturalmente na crosta terrestre. Normalmente, este elemento pode ser encontrado principalmente em vulcões e em rochas ígneas e sedimentares, intimamente associado com minerais contendo enxofre, pirita, fontes de combustíveis fósseis (MEHDI *et al.*, 2013) e, mais especificamente, a formações de óxidos ferrosos, xistos marinhos ricos em materiais orgânicos, e outros minerais como calcopirita, pirrotite e esfalerita. Também pode ser encontrado naturalmente em depósitos de carvão e cobre (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

Liberações naturais de selênio incluem atividade vulcânica, incêndios florestais, intemperismo de solos ricos em selênio e rochas, aerossóis de sal marinho e volatilização de plantas e corpos d'água (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

As emissões de selênio por meio de fontes antropogênicas incluem atividades como a extração e o uso de selênio para fabricação de produtos, as quais estão atreladas ao descarte e o gerenciamento de resíduos de substâncias, produtos ou itens fabricados com selênio (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015), efluentes de indústrias dos setores minero-metalúrgicos e indústrias químicas (RIZZO *et al.*, 2007), a queima de combustíveis fósseis, a refinação de petróleo, as descargas de águas de drenagem agrícola e a utilização de produtos agrícolas, herbicidas e inseticidas (ADIO *et al.*, 2017; ALMEIDA, 2014), além de água de escoamento de cinzas de usinas termoelétricas a carvão (IKE *et al.*, 2000).

Geralmente, o selênio de fontes naturais e antropogênicas são inseridos em ecossistemas aquáticos na forma de íons inorgânicos oxidados, selenito ou selenato. Algumas generalidades podem ser feitas em relação à forma dominante de selênio oxidada liberada pelos setores industriais: o selenito estaria presente em proporções maiores nos efluentes de usinas a carvão e refinarias de petróleo; enquanto que o selenato seria encontrado em efluentes de minas e em escoamento de áreas agrícolas (ENVIRONMENT CANADA HEALTH, 2015).

3.1.5. Aplicações do selênio

O selênio tem valor econômico considerável, utilizado em vários processos industriais com um consumo mundial estimado em 40% para a metalurgia, 25% na fabricação de vidro, 10% para a agricultura, 10% na fabricação de produtos químicos e pigmentos, 10% para a eletrônica e 5% para outras aplicações. Os principais países produtores são Japão, Canadá, Bélgica e Alemanha e estima-se uma produção global anual de cerca de 2.500 à 2.800 toneladas (TAN *et al.*, 2016).

Por possuir propriedades eletroquímicas, o elemento caracteriza-se como semicondutor e pode ser aplicado em células fotoelétricas (ALMEIDA, 2014; MACASKIE *et al.*, 2010), pois que sua condutividade aumenta em presença da luz (RIZZO *et al.*, 2007), e pode também ser utilizado em sensores para aplicações industriais e militares (TAN *et al.*, 2016).

Na fabricação de vidro, o selênio é utilizado para descolorir a cor verde do vidro das impurezas de ferro quando introduzido em pequenas quantidades (ALMEIDA, 2014), no entanto, em grandes quantidades, confere ao vidro uma coloração vermelha, sendo útil na aplicação em sinais luminosos (RIZZO *et al.*, 2007).

De acordo com Tan *et al.* (2016), o elemento também é usado como um catalisador para o realce da oxidação em soluções do chapeamento e como um aditivo metalúrgico para a maquinabilidade (habilidade de um material a ser usinado). Entre outras aplicações, selênio bruto é aplicado na vulcanização de borrachas para aumentar a resistência à abrasão (RIZZO *et al.*, 2007).

Para uso agrícola, o selenito de sódio (Na_2SeO_3) é usado como aditivo para fertilizantes, inseticidas, pulverizadores foliares (TAN *et al.*, 2016), tintas e produtos eletrônicos (HAGEMAN *et al.*, 2017).

Na área da saúde, os suplementos de selênio podem aliviar o envenenamento por mercúrio aumentando a excreção de mercúrio e também podem diminuir biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo em seres humanos (SEARS, 2013). Também se constitui em um suplemento dietético ao homem e animais, sendo fornecido em suplementos multivitamínicos em baixas concentrações (TAN *et al.*, 2016).

Além disso, o selênio também é utilizado em produtos cosméticos como na fabricação de xampus anticaxpa e de fungicidas (ALMEIDA, 2014) e se constitui em um agente de toner para impressões fotográficas (TAN *et al.*, 2016).

Alguns compostos de selênio e suas aplicações industriais são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Compostos de selênio e aplicações industriais.

Compostos de selênio	Utilização
Selênio elementar (Se⁰)	Células fotoelétricas, detonadores, catalisadores
Selenato de sódio (Na₂SeO₄)	Produção de inseticidas, vidro e medicamentos para animais
Dissulfeto de selênio (SeS₂)	Medicina veterinária
Sulfeto de selênio (SeS)	Xampus especiais e medicina veterinária
Dióxido de selênio (SeO₂)	Catalisador para oxidação, hidrogenação ou desidrogenação de compostos orgânicos
Hexafluoreto de selênio (SeF₆)	Isolante térmico gasoso
Oxicloreto de selênio (SeOCl₂)	Solvente de selênio, enxofre, telúrio, resinas, cola, asfalto
Disseleneto de tungstênio (WSe₂)	Produção de lubrificantes
Selenato cúprico (CuSeO₄)	Corantes e produção de ligas com cobre
Selenito de amônio [(NH₄)₂SeO₃]	Produção de vidro vermelho

Fonte: Almeida (2014).

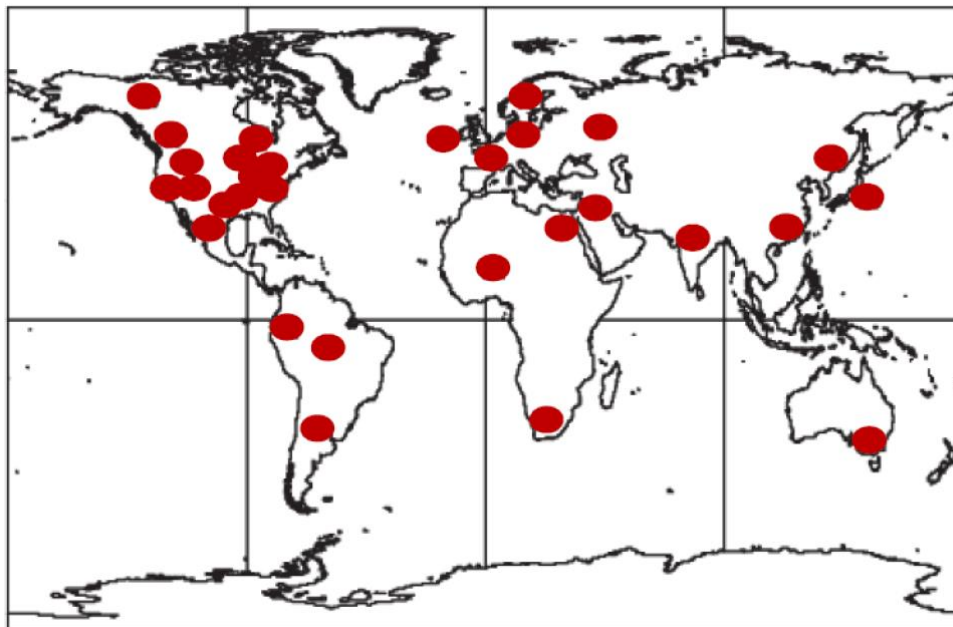
3.2. Impactos ambientais provocados pelo selênio

As águas contaminadas com selênio são produzidas por diversas atividades industriais, tais como mineração, refinarias de metal e petróleo, e na agricultura (TAN *et al.*, 2016).

Almeida (2014) apresenta os principais locais que apresentam elevada contaminação de selênio devido, principalmente, à exploração de carvão, fosfato, ouro, prata, níquel, aos processos de refinação de petróleo, combustão de carvão, fundição de metais e produção de lixiviados. Essas contaminações foram

identificadas a partir de 2004 e ocorrem em diversos locais do mundo, que são apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Locais com elevada contaminação de selênio.



Fonte: Almeida (2014).

Nos efluentes industriais, o selênio está disponível na forma de selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}) e ambos os íons do selênio são tóxicos aos organismos, sendo o SeO_3^{2-} potencialmente mais tóxico do que SeO_4^{2-} (MISHRA *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2016).

A água contendo selênio é um problema para a maioria dos organismos, especialmente para os vertebrados aquáticos dependentes de ovos onde a toxicidade torna-se mais sensível, ocasionando a mortalidade embrionária de aves aquáticas e deformidades larvais de peixes (TAN *et al.*, 2016).

Quando selênio solúvel é descartado em um ambiente aquático, causa efeitos prejudiciais nos ecossistemas devido à sua alta solubilidade, mobilidade e toxicidade. Como exemplo, Ohlendorf *et al.*, em 1986 (IKE *et al.*, 2000) relataram efeitos letais e teratogênicos em aves aquáticas causados pelo selênio solúvel contido no efluente de drenagem agrícola no oeste dos Estados Unidos. Gillespie e Baumann, também em 1986 (IKE *et al.*, 2000), relataram um efeito adverso do selênio solúvel na reprodutibilidade de organismos em uma lagoa na qual havia recebido efluente contendo selênio de uma usina de energia.

Ainda conforme Tan *et al.* (2016), o maior impacto negativo significativo do selênio é a sua capacidade de bioacumulação. A acumulação de selênio ao longo da cadeia alimentar ocorre por meio das interações das espécies envolvidas e, segundo Adio *et al.* (2017), os efeitos tóxicos são aumentados à medida que os organismos sobem a cadeia alimentar.

Os efeitos apresentados pela acumulação do selênio, acima dos limites admissíveis, podem ser distúrbios neurológicos e gastrointestinais, danos aos órgãos respiratórios e cardiovasculares, doenças de pele e câncer (ADIO *et al.*, 2017; AWUAL *et al.*, 2014).

Ao ser humano, o selênio está presente no aminoácido selenocisteína, o qual possui papel antioxidante no organismo, ajudando a neutralizar os radicais livres, estimulando o sistema imunológico e intervindo no funcionamento da glândula tireoide. No entanto, o selênio se torna tóxico e cancerígeno quando associado a algumas de suas formas orgânicas e se consumido em quantidades elevadas. Para adultos, se recomenda a ingestão diária de 55 à 70 µg de Se; enquanto a ingestão de mais de 400 µg de Se pode provocar efeitos tóxicos (RIZZO *et al.*, 2007). Dessi *et al.*, (2016) também apresenta uma necessidade nutricional humana de 30 à 85 µg por dia e estabelece o nível de toxicidade de 400 µg por dia de Se.

Dessa forma, o nível de selênio no ambiente é muito significativo porque possui um papel duplo como nutriente essencial e, por outro lado, como substância tóxica em níveis mais elevados (DORRAJI & AMANI-GHADIM, 2016).

Como forma de evitar os efeitos tóxicos do selênio solúvel, Ike *et al.* (2000) pontua que a redução do selenato e selenito em selênio elementar desempenha papel importante na desintoxicação desses íons em ambientes aquáticos.

3.3. Legislação ambiental

Em âmbito mundial, várias nações adotam um limite de 5 µg.L⁻¹ para descarga de efluente de selênio (SANTOS *et al.*, 2015).

No Brasil, em âmbito federal, a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011) estabelece os padrões de lançamento de efluentes e o limite máximo permitido para o parâmetro Selênio Total é de 0,30 mg.L⁻¹. Em

relação à legislação de Santa Catarina, a Lei Estadual nº 14.675 de 13 de abril de 2009 (BRASIL, 2009), a qual constitui o Código Estadual do Meio Ambiente, estabelece como limite máximo permitido 0,02 mg.L⁻¹ de Selênio Total.

Quanto aos testes de toxicidade, no Brasil, segue-se a norma ABNT NBR 12713:2016 “*Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*” somente para testes agudos (NBR 12713:2016).

De acordo com Tan *et al.* (2016), as diferenças nas regulamentações são devidas aos diferentes parâmetros relacionados às condições ambientais e hidráulicas observadas em todo o mundo e aos resultados de toxicidade entre organismos diferentes.

3.4. Toxicologia ambiental

O estudo da toxicologia ambiental tem o objetivo de verificar se o uso e a disposição de substâncias químicas lançadas aos ecossistemas aquáticos, terrestres e na atmosfera, não causam problemas, direta ou indiretamente, nesses meios. Com isso, por meio de testes de toxicidade observa-se o comportamento e as transformações das substâncias químicas no meio ambiente e seus efeitos sobre os organismos, principalmente de ambientes aquáticos, visto que há grande possibilidade dessas substâncias, quando depositadas no solo ou emitidas na atmosfera, alcançarem esses sistemas (CETESB, 2008).

Há diversos testes de toxicidade estabelecidos e padronizados por normas nacionais e internacionais de associações ou organizações de normalização: Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, *Association Française de Normalisation* – AFNOR, *American Society for Testing and Materials* – ASTM, *American Water Works Association* – AWWA, *Deutsches Institut für Normung* – DIN e *International Organization for Standardization* – ISO (CETESB, 2008).

Conforme a norma brasileira, os organismos-teste (peixes, crustáceos, algas, dentre outros) são expostos a diferentes concentrações da substância teste, de qualquer origem, em soluções aquosas contidas em frascos ou recipientes, por determinado período de exposição. Após esse período, geralmente 48 h para testes

agudos, verifica-se os efeitos sobre a mortalidade e comportamento (mobilidade) dos organismos-teste (CETESB, 2008).

Como as formas solúveis em água de selênio oxidado (selenato e selenito) podem causar problemas devido à sua mobilidade no ambiente aquático e possíveis efeitos de acumulação tóxica (HAGEMAN *et al.*, 2017), principalmente devido a grande quantidade de selênio lançada em corpos d'água como efluente de processos industriais (KAGAMI *et al.*, 2013), se torna importante o estudo da toxicidade causada por esse elemento sobre organismos aquáticos.

A toxicidade do selênio foi confirmada pela primeira vez em 1933 por Spalholz, mediante a confirmação da presença do elemento no fígado de animais domésticos que morreram após terem consumido plantas acumuladoras de selênio (*Astragalus*, *Xyloriza*, *Oonopus* e *Stanleya*). Atribui-se que a sua toxicidade esteja relacionada diretamente à sua habilidade oxidante, catalisando o processo de oxidação dos tióis (compostos organossulfurados) e, simultaneamente, gerando radicais superóxidos. Esse fenômeno, conhecido como estresse oxidativo, provoca morte celular por apoptose ou necrose (RIZZO *et al.*, 2007).

3.5. Tecnologias de tratamento de efluentes contendo Se

As principais tecnologias de tratamento dos efluentes industriais contendo selênio baseiam-se na precipitação química, adsorção, processo de membrana de eletro-coagulação, de troca iônica e osmose reversa (ADIO *et al.*, 2017; AWUAL *et al.*, 2014; KURODA *et al.*, 2011).

No entanto, a remoção química e/ou física é considerada ineficiente devido o efluente tratado apresentar concentração de selênio acima dos limites máximos permitidos em legislação (RIZZO *et al.*, 2007) e bastante onerosa para indústrias, devido aos elevados custos operacionais. Somado a isto, o uso de produtos químicos tóxicos limita a aplicação dessas tecnologias (DORRAJI & AMANI-GHADIM, 2016; KURODA *et al.*, 2011).

Por esta razão, a remoção de selênio representa um sério problema para as indústrias e, portanto, há uma necessidade urgente de explorar novos métodos que

tenham baixo custo de capital e riscos ambientais para a remoção de selênio das águas residuais (AWUAL *et al.*, 2014).

Outra tecnologia que pode ser aplicada é a redução de selenito ou selenato em selênio elementar (menos tóxico) por processos envolvendo micro-organismos (MISHRA *et al.*, 2011). A redução microbiana de íons selênio ao selênio elementar em biorreatores é uma alternativa promissora para o tratamento de efluentes ricos em selênio (DESSI *et al.*, 2016).

3.5.1. Redução Química

O selenato pode ser reduzido a selenito por processos químicos. A redução química do selenato precisa de um agente redutor forte, como por exemplo o hidróxido de ferro, que reduz o íon ao selenito ou diretamente a selênio elementar. No entanto, o agente redutor pode não ser recuperado totalmente após a reação por ter sido oxidado no processo (HAGEMAN *et al.*, 2017).

A redução química requer condições operacionais de estrito controle de pH e de adição de reagentes, o que faz com que o tratamento tenha um custo razoavelmente elevado (RIZZO *et al.*, 2007).

3.5.2. Precipitação química

O selênio é geralmente removido de efluentes industriais por precipitação química utilizando, por exemplo, sal férrico. No entanto, o processo de tratamento gera quantidades enormes de resíduos de lodo químico contendo selênio não reutilizável. Dessa forma, é necessário desenvolver um processo alternativo para recuperar as formas recicláveis de selênio da fase aquosa para sua utilização sustentável (KAGAMI *et al.*, 2013).

3.5.3. Adsorção

O uso de adsorventes sólidos apresentou-se eficiente devido a facilidade de separação de fases e alta eficiência de remoção. Os leitos adsorventes que se demonstram mais eficazes são constituídos por: polímero carregado com óxido de zircônio, hidróxidos duplos em camadas, alumina ativada e nanopartículas de ferro zerovalente. Esta última, apresenta-se como uma tecnologia promissora para a remoção de íons de selênio oxidado, no entanto, preocupações foram levantadas sobre o uso de substâncias químicas perigosas durante a síntese dessas nanopartículas (ADIO *et al.*, 2017).

3.5.4. Tratamento biológico

A tecnologia alternativa para remoção de selênio de efluentes é a partir do tratamento biológico.

Em ambientes naturais, sabe-se que certos micro-organismos são capazes de converter selenato e selenito na fase aquosa em compostos insolúveis, como selênio elementar ($S_{(0)}$), e voláteis, como dimetilseleneto (DMSe), dimetildisseleneto (DMDS_e), dimetilselenenilsulfureto (DMSeS), seleneto de hidrogênio (H_2Se) e metanelelenol (MeSeH) (KAGAMI *et al.*, 2013).

No entanto, com o lançamento de efluentes contendo elevada concentração de selênio, a biota aquática existente não possui capacidade suficiente de remediação. Dessa forma, para a redução biológica do selenato ao selenito em biorreatores para tratamento de efluentes é utilizada uma biomassa específica capaz de bioconverter esse elemento, sob condições ambientais moderadas, exigindo menos energia e produtos químicos do que a redução química. (HAGEMAN *et al.*, 2017).

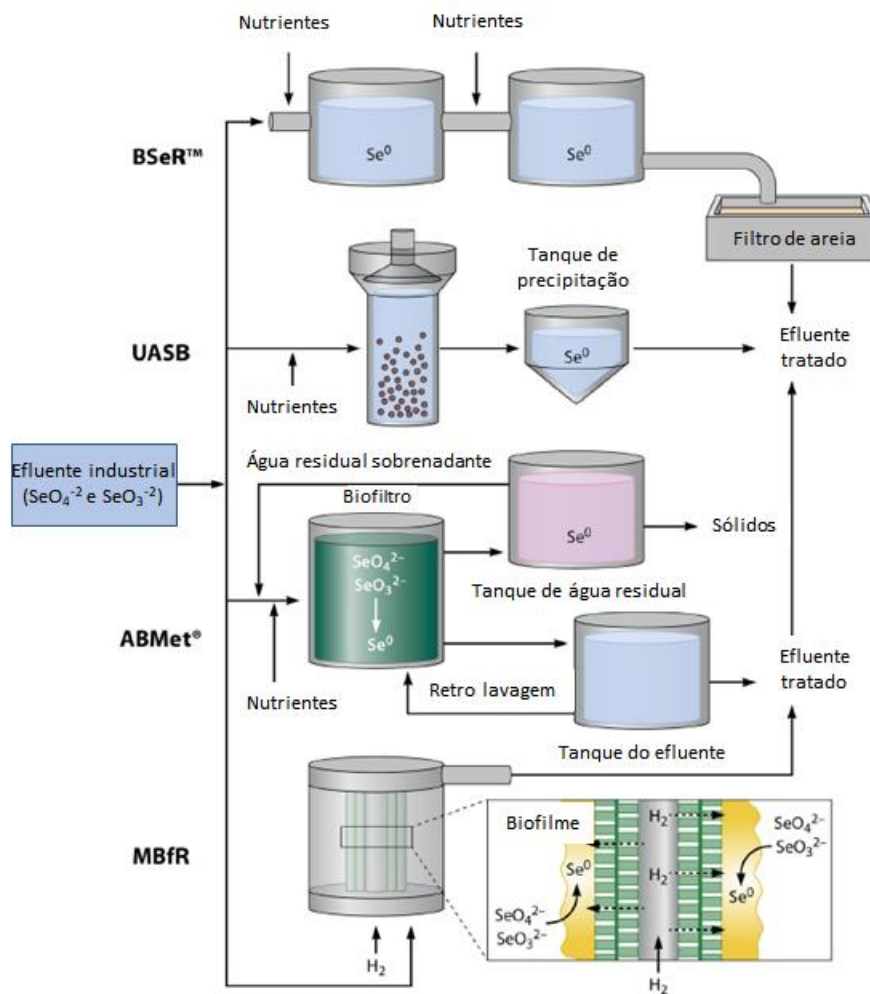
De acordo com Rizzo *et al.* (2007), biossorção é definida como a remoção de íons metálicos por meio de adsorção ou complexação por biomassa microbiana.

No tratamento biológico, íons de elementos de menor abundância, como o selênio, podem ser utilizados como aceptores finais de elétrons na respiração

anaeróbica de bactérias presentes em ambientes anaeróbios ou anóxicos. Os íons selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}), que se assemelham quimicamente ao íon sulfato (SO_4^{2-}), podem ser reduzidos (redução dissimilativa) promovendo a transformação dessas espécies tóxicas de selênio dos efluentes em forma não tóxica e insolúvel (Se^0) ou em formas voláteis (DMS_e) e, portanto, passíveis de eliminação natural (RIZZO *et al.*, 2007).

Nancharaiah & Lens (2015b) apresentam diferentes sistema de tratamento de efluentes para remoção de SeO_4^{2-} e SeO_3^{2-} . Os diferentes biorreatores propostos foram de biofilme (BseR), de biofilme de membrana (MBfRs), de leito anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) e biofiltros (ABMet) e são apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Processos biotecnológicos para redução de íons de selênio.



Fonte: adaptado de Nancharaiah & Lens (2015b).

De acordo com a Figura 6, a tecnologia BSeR é composta por reatores de biofilmes de leito fixo dispostos em carvão ativado granular e um sistema de retro lavagem para recuperação de, aproximadamente, 97 % de Se_0 do BSeR. Nos reatores UASB, os autores indicam que provavelmente o selenato foi reduzido por bactérias redutoras de sulfato sob condições metanogênicas, sendo esse processo promissor devido a possibilidade de recuperação de água, selênio e energia. Para ambas as tecnologias, foram adicionadas fontes de carbono como o melaço (BSeR) e ácido acético e fósforo (UASB) para facilitar o crescimento microbiano e a redução dos íons de selênio. Outra tecnologia apresentada é a ABMet que consiste em um tanque de biofiltro, um tanque de retro lavagem, um tanque de resíduos da lavagem e um tanque de dosagem de nutrientes, também a base de melaço, para autossustentação do biofiltro. O último sistema apresentado, o MBfR, é composto por um reator de biofilme de membranas com feixes de fibra oca que fornecem H_2 para o biofilme, o qual se desenvolve nas paredes externas das membranas. O uso de H_2 serve como doador de elétrons inorgânico à biorredução de aceptores de elétrons solúveis (NO_3 , NO_2 , SeO_4^{-2} e ClO_4), sendo que bactérias redutoras de selênio dissimilatório do biofilme convertem SeO_4^{-2} em Se_0 . No entanto, os autores indicam que este último sistema de tratamento é promissor mas até então não havia sido implementado em escala industrial pelo custo do fornecimento de H_2 e questões práticas de instalação (NANCHARIAH & LENS, 2015b).

Diversas bactérias capazes de realizar reações de redução do selênio foram isoladas e, algumas delas, foram amplamente caracterizadas para o desenvolvimento de estratégias eficientes para a biorremediação de ambientes aquáticos contaminados com selênio solúvel (IKE *et al.*, 2000). Um dos micro-organismos mais conhecidos por reduzir selênio enzimaticamente é *Pseudomonas stutzeri* (LLOYD, 2003; TSUBASA *et al.*, 2013).

Conforme Rizzo *et al.* (2007), desde 1996 pesquisadores já vinham investigando, em escala de bancada, a remoção de selênio de efluentes agrícolas e de atividades de mineração com uso de bactérias ou enzimas imobilizadas. Em particular, a bactéria *P. stutzeri* foi isolada de um efluente de mineração pelos pesquisadores, sendo identificada como a espécie responsável pela remoção de selênio do efluente. Confirmou-se, assim, que essa bactéria possui, em condições aeróbicas, a habilidade de reduzir a concentração de selênio.

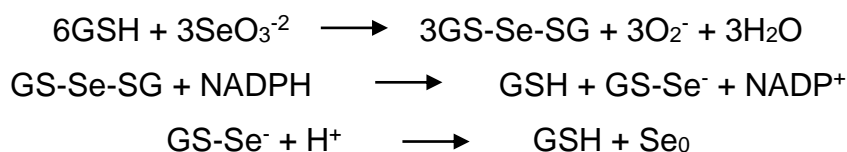
Outra linhagem de *P. stutzeri*, a NT-I, isolada de efluente de drenagem de uma refinaria de selênio, também mostrou-se capaz de reduzir o selenato e o selenito para o selênio elementar (Se₀) em condições aeróbicas (KURODA *et al.*, 2011; KAGAMI *et al.*, 2013). Além disso, a linhagem NT-I é capaz de volatilizar o selênio solúvel em altas taxas, constituindo um catalisador de biovolatilização para a recuperação de selênio (KAGAMI *et al.*, 2013).

Em condições anaeróbicas, bactérias utilizam íons de selênio como receptores de elétrons terminais reduzindo-os ao selênio elementar por meio de redução desassimilativa. Em condições aeróbicas ou microaerofílicas, esses íons são reduzidos pelo processo de homeostase desintoxicante. A desintoxicação de SeO₄⁻² e SeO₃⁻² por micro-organismos pode ser realizado por diversos mecanismos (NANCHARAIAH & LENS, 2015b).

De acordo com os autores mencionados anteriormente, a redução dos íons de selênio é energeticamente favorável e produz 529,5 kJ/mol de acetato e 164 kJ/mol de lactato. A relação estequiométrica para a redução de SeO₃⁻² a Se₀ acopladas à oxidação incompleta do lactato como doador de elétrons para o acetato é:



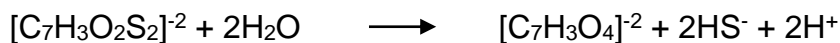
No entanto, para alguns micro-organismos a redução de SeO₃⁻² ativa as enzimas redutases respiratórias de nitrito ou de sulfito na respiração anaeróbia. Esse mecanismo de redução é denominado de sistema de tiorredoxina redutase e o processo é mediado por grupos tióis no citoplasma como estratégia de desintoxicação microbiana. O SeO₃⁻² reage com a proteína glutathiona (GSH) e forma a selenodiglutationa (GS-Se-SG), a qual em seguida é reduzida para selenopersulfureto de glutathiona (GS-Se⁻) pela NADPH-glutathiona redutase. O GS-Se⁻ constitui-se em um intermediário instável e é hidrolisado para formar Se₀. As reações podem ser observadas a seguir (NANCHARAIAH & LENS, 2015b).



Ainda com base nos autores, outro mecanismo de redução do íon por micro-organismos é a reação de Painter. Painter observou alta reatividade entre SeO_3^{-2} e grupos tióis e demonstrou a formação de selenotrisulfeto (RS-Se-SR) pela reação:



Também há redução mediada por sideróforo de ferro (ácido tiocarboxílico), o qual é produzido por *P. stutzeri* KC e foi proposto como mecanismo de desintoxicação de selenito por meio da redução do íon e formação de precipitado de Se_0 . Para isso, uma reação de hidrólise deve ocorrer para liberação do ácido dipicolínico ($[\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_4]^{-2}$) e HS^- , que é reduzido a Se_0 . A reação é apresentada a seguir, conforme Nancharaiyah & Lens (2015b).



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Ensaio de bioabsorção

Foram realizados 36 ensaios de cultivo empregando como inóculo (bioabsorvente) *Pseudomonas stutzeri* CCT 7544 (ATCC 31258) e *P. putida* KT2440 e diferentes concentrações iniciais de selênio total (sorbato) no meio reacional.

Inicialmente, foram realizados ensaios com cada um dos dois bioabsorventes em meio sintético, a fim de verificar a capacidade de bioabsorção de cada uma das cepas avaliadas nas diferentes composições de meios estabelecidas. Em seguida, as mesmas cepas foram cultivadas em meios contendo o efluente industrial coletado entre a saída da linha de produção de selenito e a Estação de Tratamento de Efluentes (ETE). Nesse percurso, o efluente vem sendo, normalmente, submetido a tratamento químico com uso de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) pela empresa para recuperação (precipitação) ou redução do selênio residual presente.

4.1.1. Ativação das células

Os micro-organismos *P. stutzeri* e *P. putida* foram conservados sob congelamento, em glicerol, no laboratório de Biotecnologia da UNIVILLE. Antes dos ensaios de bioabsorção, as cepas foram ativadas por cultivo a 30 °C, sob agitação constante (frequência de agitação de 150 min^{-1}) em agitador orbital da marca CERTOMAT® S., durante 24 h em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo os meios específicos para cada bactéria, em pH inicial de 6,8 previamente esterilizado em autoclave a vapor a 120 °C durante 15 min.

As células da bactéria *P. stutzeri* foram ativadas em 100 mL de caldo nutriente (5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne). Enquanto que as células de *P. putida* foram ativadas em meio contendo Na_2HPO_4 (6,36 g/L), KH_2PO_4 (2,7 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4,7 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8 g/L), glicose (9 g/L) e caldo nutriente (1 g/L). Todos os meios de ativação seguiram as especificações do fabricante.

4.1.2. Inóculo para os ensaios de biossorção

Em todos os ensaios de biossorção foi utilizado como inóculo 20 mL de suspensão microbiana resultante da ativação das células, com leitura no espectrofotômetro a absorvância de 1.100. A inoculação dos frascos reacionais contendo a solução-problema com diferentes composições de meio de cultivo foi, sempre, realizada em câmara de fluxo laminar.

4.1.3. Ensaios de biossorção com meio sintético

Os ensaios foram conduzidos em duplicata, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 220 mL de volume de trabalho, contendo 10 % (v/v) de inóculo, em condições anaeróbicas, a 30 °C, 150 min⁻¹ durante 48 h.

Como sorbato foi utilizado selenito de sódio (produto comercial, lote 001/15) com 98 %, sendo 50 % de pureza em selênio total.

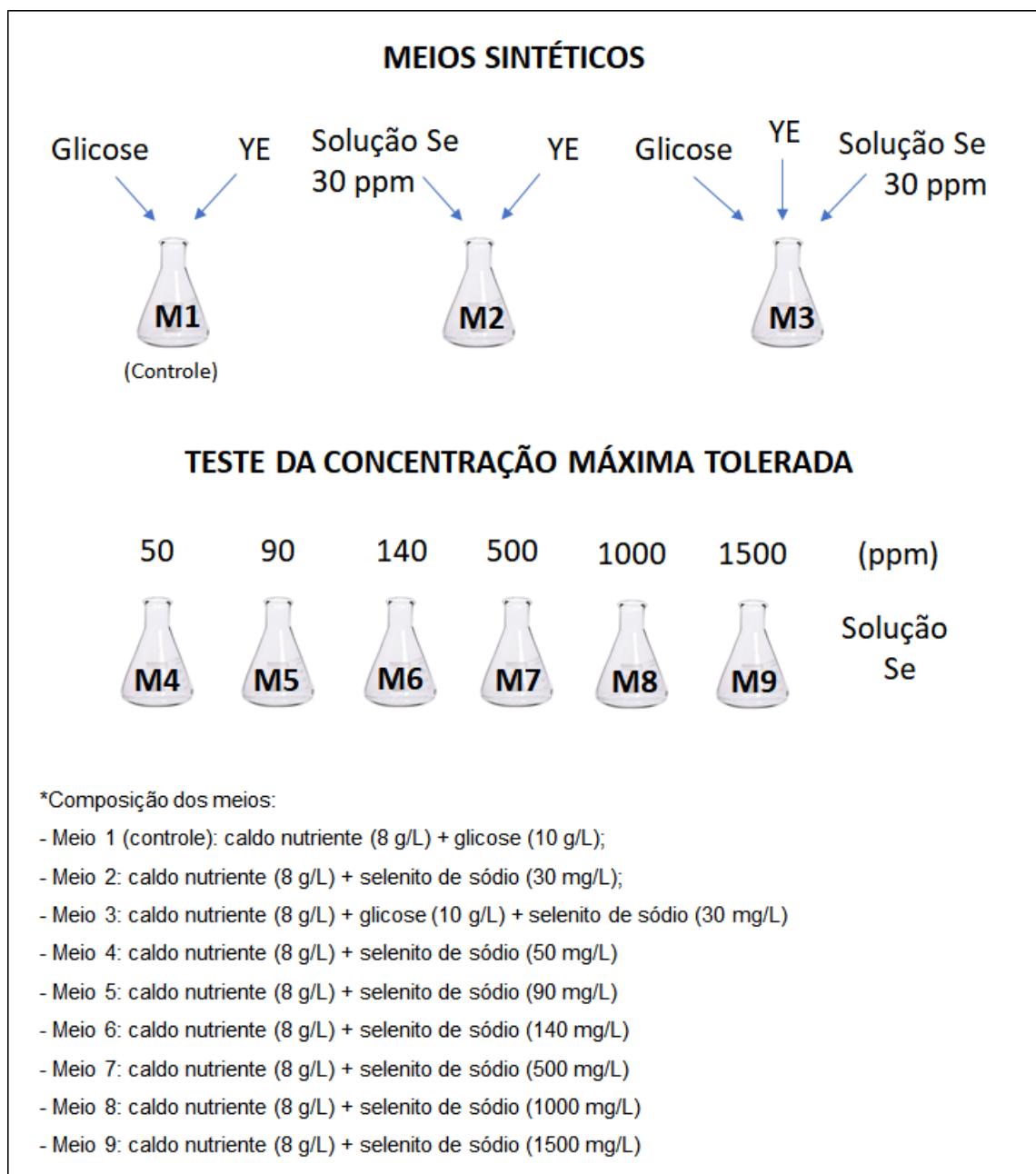
O meio M1, descrito como controle, foi utilizado no cultivo de cada uma das bactérias para estabelecer as relativas cinéticas de crescimento microbiano e consumo de substrato, na ausência do sorbato (Na₂SeO₃). Os resultados desses ensaios foram utilizados para comparar e avaliar o comportamento cinético desses micro-organismos nos demais meios de cultivo (M2 a M9), com diferentes concentrações do composto.

A concentração inicial de 30 mg/L de Na₂SeO₃ na solução-problema foi estabelecida em função de ser a mesma daquela normalmente recebida pela Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), conforme informações recebidas da indústria química geradora do efluente.

O aumento das concentrações de selenito nos ensaios M4 a M9, visaram estabelecer a capacidade máxima de biossorção dos micro-organismos em cada caso.

Para cada uma das duas cepas avaliadas, foram realizados nove ensaios com diferentes concentrações iniciais de selenito de sódio (Na_2SeO_3), conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 – Ensaios de cultivo de *P. stutzeri* e *P. putida* em meios sintéticos* com diferentes concentrações de selenito de sódio.



OBS.: YE = caldo nutriente.

4.1.4. Caracterização do efluente industrial

Foram realizadas análises de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio); determinados os valores de pH (potencial hidrogeniônico) e salinidade nas amostras de efluente industrial coletadas na empresa.

A partir da indicação da empresa, foram coletadas três diferentes amostras de efluente ao longo da corrente de descarga até a ETE, contendo, cada uma delas, concentrações de selênio total de 30 mg/L, 268 mg/L e 927 mg/L (dados fornecidos pela empresa de acordo com análises internas).

4.1.4.1. Determinação de DQO

A determinação de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi realizada empregando o Kit DQO Reagente da Hach, na faixa de 0 a 1500 mg O₂.L⁻¹.

Seguindo metodologia proposta pelo fornecedor, foram adicionados 2 mL de amostra ao tubo de vidro contendo o reagente kit DQO/Hach (solução para digestão DQO) e então acondicionado em aparelho digestor Hach modelo Digital Reactor Block 200, (DRB200) a 150 °C durante 2 h. Em seguida, a mistura foi resfriada em béquer com água e gelo e conduzida para a leitura de absorbância em espectrofotômetro HACH DR/4000U programa 2720, com comprimento de onda 620 nm. Para cada amostra digerida foram realizadas três leituras de absorbância.

4.1.4.2. Determinação da DBO₅

Os valores da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅), foram determinados empregando-se metodologia proposta pela HACH.

O método consiste em adicionar amostra em um frasco contendo reagente tampão nutritivo do kit HACH. Em seguida os frascos com as amostras foram conectados ao aparelho de MOD.DBOTraK-HACH através de sondas com tampas em roscas, onde permaneceram em sistema de agitação na estufa incubadora bacteriológica em temperatura de 20 °C, durante 5 dias, e então realizada leitura do resultado no próprio equipamento.

4.1.4.3. Determinação de pH e salinidade

Para determinar os valores de pH foi utilizado o pHâmetro de bancada com faixa de pH de 0 à 14.

Os percentuais de salinidade foram obtidos com o uso do refratômetro portátil Mingda Coltd®.

4.1.5. Tratamento biológico do efluente industrial

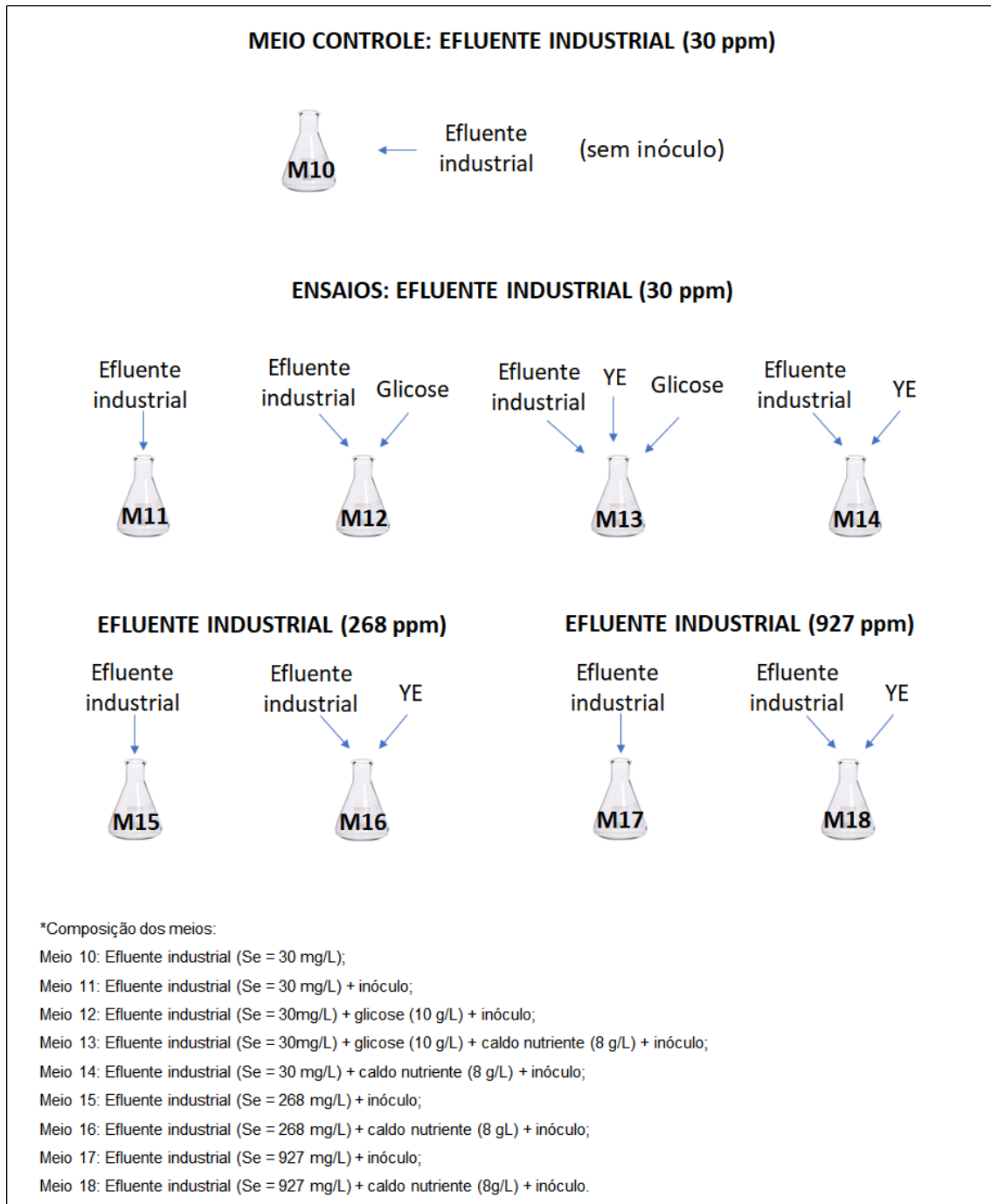
Inicialmente, os ensaios foram realizados com efluente na concentração de 30 mg/L de selênio, em função da mesma justificativa descrita no item 4.1.3.

Posteriormente, verificou-se a influência do tratamento físico-químico da empresa na biossorção de selênio. Para isso, foram realizados ensaios com o efluente em concentrações maiores de selenito de sódio e, conseqüentemente, menores concentrações de ditonito de sódio (produto adicionado no tratamento físico-químico).

As concentrações disponibilizadas pela empresa foram de 268 e 927 mg/L de selênio. Devido a característica ácida do efluente, o pH inicial das soluções foram corrigidas para 6,0 com HCl 30M.

Para o tratamento biológico do efluente industrial, foram realizados 18 ensaios de biossorção, nove para cada um dos micro-organismos avaliados, conforme pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Ensaios de cultivo de *P. stutzeri* e *P. putida* em meios efluente industrial* com diferentes concentrações de selênio total.



OBS.: YE = caldo nutriente.

4.1.6. Amostragem

Para determinação do consumo de substrato e avaliação do crescimento celular foram coletadas amostras de 2 mL a cada 1,5 horas durante as primeiras 9 h de cultivo e em 48 h. Para as análises de concentração de selênio foram coletadas amostras de 30 mL no tempo inicial (t_0) e no tempo final (t_f) do experimento.

4.1.7. Análise do crescimento celular

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado por turbidimetria. As amostras foram coletadas em eppendorff de 2 mL, centrifugadas durante 6 min, rotação de 10.000 rpm em rotor de ângulo fixo (3.285 G). As células foram ressuspensas em 2 mL de água deionizada e homogeneizadas. A medição da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (600 nm). O sobrenadante foi transferido para outro eppendorff para análises de consumo de substrato.

Para a determinação da concentração de biomassa seca (X) foi realizada análise gravimétrica. Esta técnica envolveu a medição da DO e a filtração a vácuo de 40 mL e 20 mL da suspensão microbiana em crescimento através de membrana GS em éster de celulose marca Millipore®, porosidade 0,22 μm , diâmetro 47 mm (previamente secas a 70 °C durante 24 h). A massa celular retida juntamente com o filtro foi novamente seca a 70 °C até massa constante (24 h).

Os valores de X foram calculados conforme Equação 1.

$$X = \frac{a - b}{c} \quad (1)$$

Onde, a é a massa seca de células com a membrana filtrante (g), b é a massa seca apenas da membrana (g) e c é o volume da amostra filtrada (L).

As curvas de calibração do crescimento celular para *P. stutzeri* e *P. putida* são apresentadas no Apêndice A.

4.1.8. Análise da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método GOD-POD onde a glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Por meio de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorvância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

Todas as amostras foram previamente centrifugadas durante 10 min a 6.000 rpm em rotor de ângulo fixo (3.285 G). Para cada 20 µL de amostra foram adicionados 1 mL de reativo em cubeta. Para reação, as amostras foram colocadas na estufa a 37 °C por 20 min e realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro.

Para cada aplicação do método foi elaborada uma curva de calibração com concentrações de glicose variando de 0,1 a 0,625 g/L. As curvas de calibração são apresentadas no Apêndice B.

4.1.9. Análise da concentração de Se Total

As análises de concentração de selênio iniciais e finais foram realizadas pela empresa geradora do efluente de Joinville/SC, empregando espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP) (metodologia interna, não divulgada). Todas as análises foram acompanhadas de uma solução padrão de selenito de sódio P.A., para validação dos resultados analíticos obtidos. Para cada análise foram enviadas à empresa um volume mínimo de 30 mL/amostra, previamente centrifugadas durante 10 min a 6.000 rpm em rotor de ângulo fixo (3.285 G) e congeladas a -4 °C para conservação. Devido ao grande número de ensaios realizados foram realizadas apenas as análises de amostras iniciais e finais, a maioria delas sem

duplicatas. Para análise estatística, apenas os ensaios M15 à M18 foram analisados em triplicata.

4.1.10. Parâmetros cinéticos

O percentual de redução do selênio inicialmente presente no meio de cultivo pelos micro-organismos avaliados ou eficiência de biossorção (R) foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$R = \frac{Se_o - Se_f}{Se_o} \cdot 100 \quad (2)$$

A capacidade da biomassa celular de reduzir a concentração de selenito no meio tratado (Y) foi estimada a partir da Equação 3 e expressa na unidade mg/g.

$$Y = \frac{Se_o - Se_f}{X} \quad (3)$$

Onde, Se_o é a concentração inicial de selênio (mg/L), Se_f é a concentração final de selênio (mg/L) e X é variação da concentração de células ($X_f - X_i$) em massa seca (g/L).

4.1.11. Análise estatística

As variações estatísticas (para os ensaios em triplicata) foram tratadas pelo teste Q de Dixon (teste estatístico para rejeição de valores desviantes) (RORABACHER, 1991) e analisadas pelo método ANOVA com teste de Tukey para $P < 0,05$ empregando o programa computacional Origin 2015.

4.2. Testes toxicológicos

No decorrer do estudo foram realizados testes de toxicidade aguda com o organismo *Daphnia magna* do meio sintético (solução de selenito de sódio) e do efluente industrial, antes e após tratamento biológico com *Pseudomonas*.

4.2.1. Cultivo dos organismos-teste

O cultivo dos organismos-teste foi realizado no laboratório de Toxicologia Ambiental da UNIVILLE. A *Daphnia magna* foi cultivada em meio natural (água do Rio Quiriri) mantida em incubadora com fotoperíodo (12 h com presença de luz e 12 h com ausência de luz), em 25 °C e alimentadas com alga *Scenedesmus subspicatus* sp. O cultivo é baseado na ABNT NBR 12.713:2016.

4.2.2. Teste de sensibilidade dos organismos-teste

A sensibilidade dos organismos-teste foi testada mensalmente por meio de carta controle, com objetivo de assegurar a qualidade dos mesmos dentro dos padrões internacionais, conforme ISO 6341:1996, para garantir a validação dos testes objeto deste estudo.

O teste de sensibilidade baseia-se em testes de toxicidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Consideram-se aptos para utilização em bioensaios os neonatos produzidos em lotes de cultivos que apresentam $CE_{50\%}$ (concentração efetiva em 50 % das amostras) entre 0,6 e 1,7 mg/L de dicromato de potássio em 24h de cultivo, conforme ISO 6341:1996.

No período de realização dos testes (outubro/2018), o teste de sensibilidade apresentou $CE_{50\%}$ de 0,71 mg/L para a substância de referência ($K_2Cr_2O_7$), assegurando a credibilidade dos testes desenvolvidos, pois a sensibilidade do cultivo esteve dentro do recomendado pela norma internacional ISO 6341:1996.

4.2.3. Testes de toxicidade aguda

Os testes ecotoxicológicos foram realizados conforme as determinações da Portaria nº 017/2002 da FATMA – Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina (atual IMA – Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina) e da ABNT NBR 12.713:2016.

Para os testes foram utilizadas as amostras do meio sintético (solução de selenito de sódio conforme meio M2) não-tratado e pós-tratamento (T1 e T2, respectivamente) e do efluente industrial (conforme meio M13) não-tratados e pós-tratamento (T3 e T4, respectivamente), com uso de *P. putida*.

Cada teste foi conduzido em 4 tubos com 5 organismos testes em cada (*Daphnia magna*), contendo 10 mL das amostras definidas anteriormente, sendo todos os testes realizados em quadruplicata.

Os tubos foram mantidos em incubadora com fotoperíodo (12 h com presença de luz e 12 h com ausência de luz), em 25 °C. Os organismos testes foram alimentados no início do teste com alga *Scenedesmus subspicatus* sp. Após 48 h, foi realizada a leitura das amostras, observando a letalidade e/ou imobilidade dos microcrustáceos.

Os testes foram realizados com fator de diluição de 50%, 25%, 10% e 1%.

O fator de diluição (FD) considerado para comparação com a legislação estadual em vigor é de 2, ou seja, as amostras são diluídas em 50%, conforme a Tabela I do Anexo da Portaria nº 017/2002 do IMA para a origem dos efluentes de indústria química de produtos químicos.

Também foi avaliada a CE_{50%} (concentração efetiva em 50 % das amostras) para cada teste por meio de avaliação estatística com o auxílio do software *Trimmed Spearman-Kärber Method* versão 1.5.

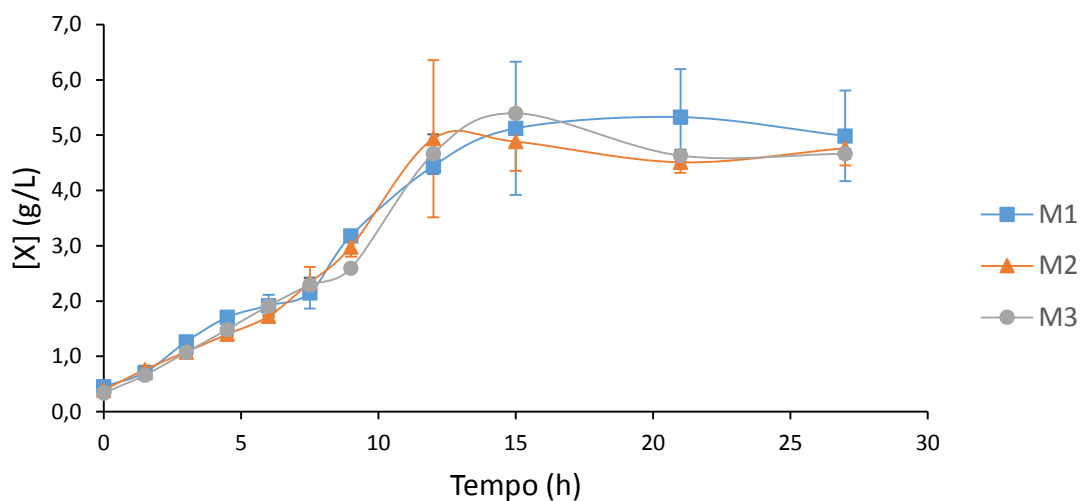
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Tratamento biológico de meio sintético

5.1.1. Ensaio com solução de selenito 30 mg/L

O crescimento anaeróbico de *P. stutzeri* nos ensaios M1 (10 g/L de glicose + 8 g/L de caldo nutriente), M2 (30 mg/L de selenito + 8 g/L de caldo nutriente) e M3 (30 mg/L de selenito + 10 g/L de glicose + 8 g/L de caldo nutriente) é mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de *P. stutzeri*.



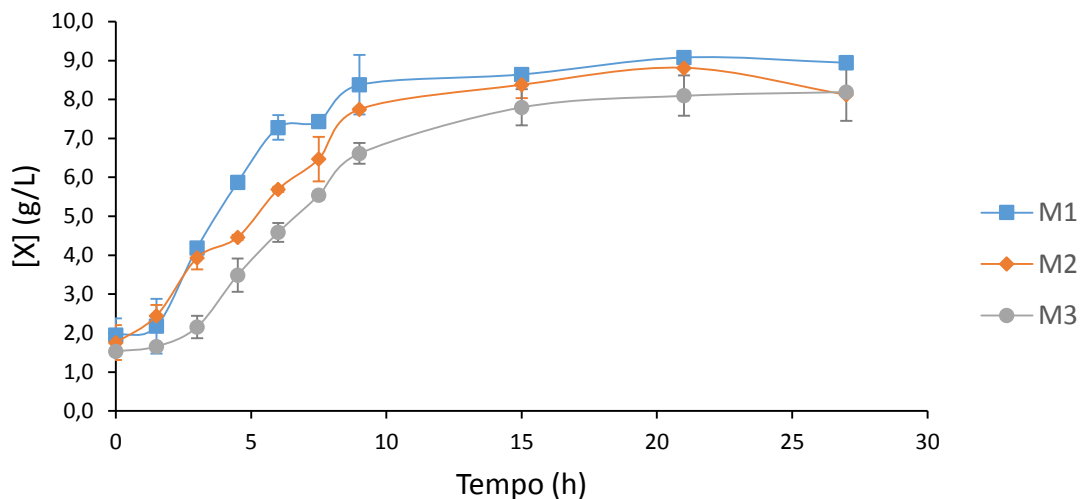
No meio controle (M1), sem a presença de selenito, *P. stutzeri* exibiu um crescimento exponencial até 15 h de incubação e, após esse período, reduziu a taxa de crescimento até atingir a fase estacionária. A concentração máxima de células foi de $5,33 \pm 0,86$ g/L.

Comportamento semelhante ocorreu aos ensaios M2 e M3, ambos com presença da solução de selenito de sódio. No entanto, em M2 *P. stutzeri* alcançou a fase estacionária após 12 h de cultivo, tempo inferior em relação ao M1 e M3 (15

h). As concentrações máximas obtidas em M2 e M3 foram de $4,94 \pm 1,42$ g/L e $5,39 \pm 0,07$ g/L, respectivamente, sem diferença significativa.

Nos ensaios realizados com a bactéria *P. putida*, o crescimento microbiano nos ensaios M1, M2 e M3 é mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de *P. putida*.



Como pode-se observar, as curvas de crescimento celular se diferenciaram mais uma das outras em comparação às curvas obtidas com *P. stutzeri*. Em M1 o crescimento exponencial ocorreu até 9 h de cultivo, enquanto que nos ensaios M2 e M3, ocorreu até, aproximadamente, 15 h.

As concentrações máximas em M1, M2 e M3 foram de $9,08 \pm 0,15$ g/L, $8,81 \pm 0,02$ g/L e $8,19 \pm 0,74$ g/L, respectivamente, sem diferença significativa.

Quanto ao consumo de glicose, *P. stutzeri* esgotou a glicose do meio após 12 h de incubação para os ensaios M1 e M3. Já *P. putida* levou entre 15 a 20 h para consumir totalmente o substrato em ambos os ensaios. As curvas de consumo de glicose de *P. stutzeri* e *P. putida* são apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 11 – Consumo de glicose nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de *P. stutzeri*.

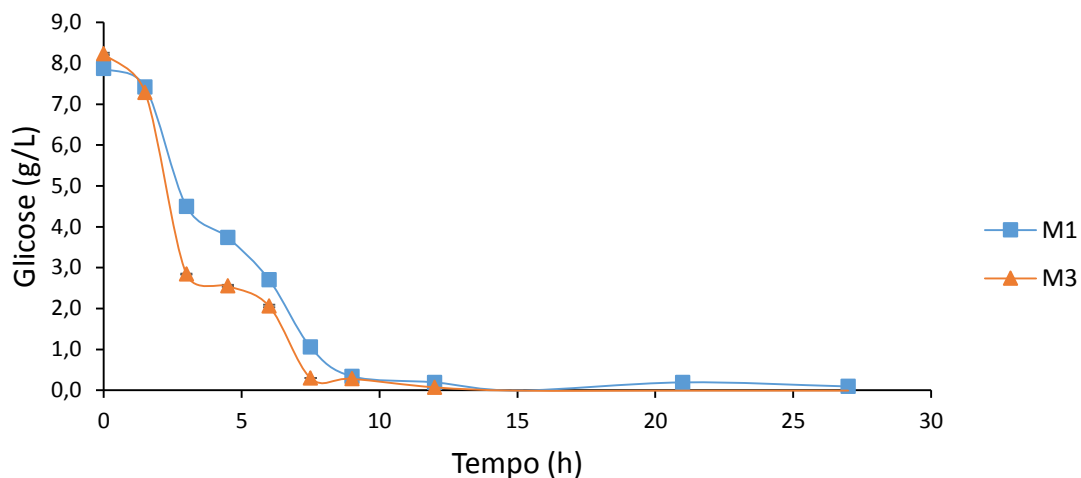
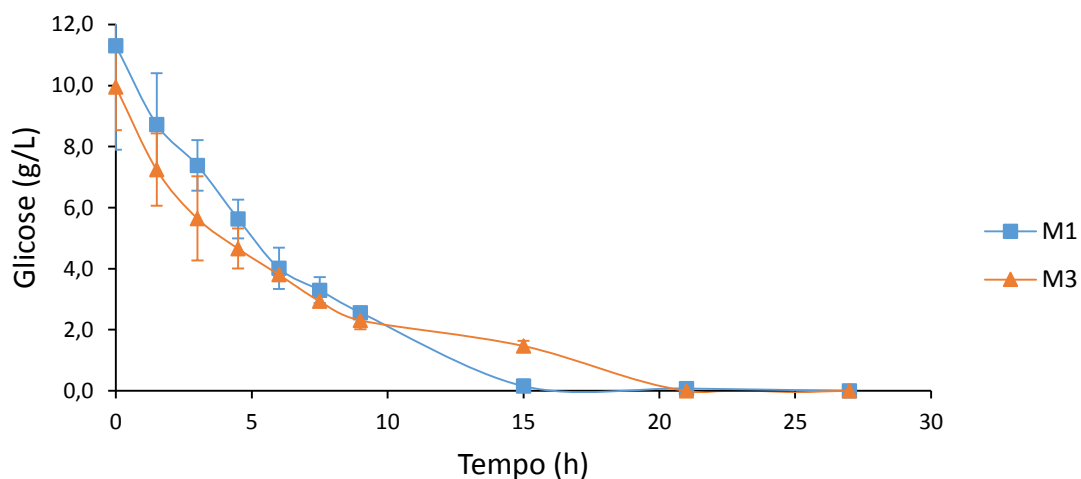


Figura 12 – Consumo de glicose nos ensaios em meio sintético M1 (glicose e caldo nutriente), M2 (selenito de sódio e caldo nutriente) e M3 (selenito de sódio, glicose e caldo nutriente) de *P. putida*.



A partir dos resultados obtidos de cada bactéria, verificou-se que não há necessidade da adição de glicose para o crescimento celular e que a concentração de 30 mg/L de selenito de sódio não inibiu o crescimento bacteriano.

Ambas as bactérias foram capazes de reduzir selenito do meio eficientemente. Com as concentrações de selênio total inicial e final foi possível obter a eficiência de bioissorção promovida pelos ensaios. Além disso, a partir da concentração celular inicial e final, foi possível obter a capacidade de bioissorção, em $\text{mg}_{\text{Se}}/\text{g}$ de células.

As concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, a eficiência (R) e capacidade (Y) de bioissorção dos ensaios M2 e M3 para *P. stutzeri* e *P. putida*, são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios em meio sintético a 30 mg/L de selenito (M2 e M3) de *P. stutzeri* e *P. putida*. Tempo de cultivo (t_f) de 27 h.

Micro-organismo	Meio	Se_i (mg/L)	Se_f (mg/L)	R (%)	Y (mg/g)
<i>P. stutzeri</i>	M2 (sem glicose)	21,31 ± 0,77	3,33 ± 0,002	84,34 ± 0,56	4,13 ± 0,59
	M3 (com glicose)	25,54 ± 4,24	3,68 ± 0,36	85,26 ± 3,86	5,03 ± 0,84
<i>P. putida</i>	M2 (sem glicose)	29,28 ± 0,52	5,00 ± 0,29	82,91 ± 0,68	3,82 ± 0,22
	M3 (com glicose)	21,64 ± 1,53	3,13 ± 0,28	85,54 ± 0,29	2,81 ± 0,53

Para *P. stutzeri*, nos ensaios M2 e M3, foi obtida a redução de 84,34 ± 0,56 % e 85,26 ± 3,86 %, respectivamente. Resultado semelhante, estatisticamente, foi alcançado por *P. putida*, com 82,91 ± 0,68 % e 85,54 ± 0,29 %, respectivamente.

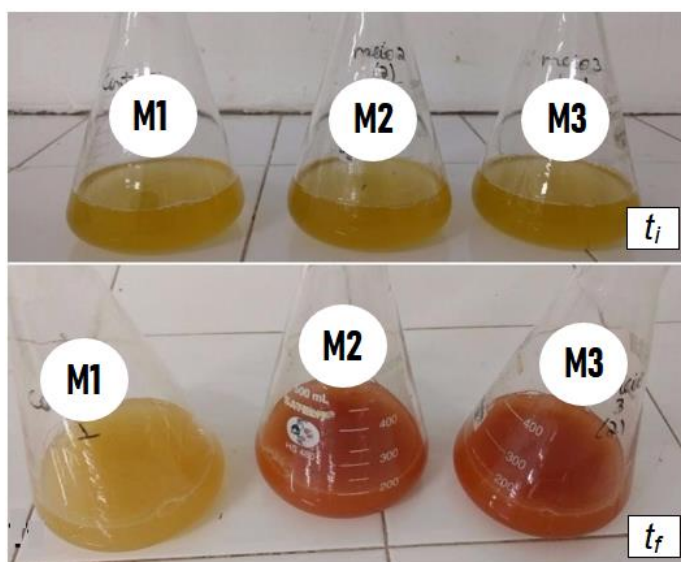
P. stutzeri obteve capacidades de bioissorção (Y) de 4,13 ± 0,59 mg/g em M2 e 5,03 ± 0,84 mg/g em M3. Enquanto que *P. putida* apresentou capacidade de bioissorção de 3,82 ± 0,22 mg/g em M2 e 2,81 ± 0,53 em M3. Isso significa que, mesmo com valores de eficiência (R) semelhantes, *P. putida* apresentou menor capacidade de bioissorção de selenito no ensaio M3 em relação a *P. stutzeri*.

Resultados similares foram obtidos por Lortie *et al.* (1992), com redução de 84% de selênio após 24 h, em meio sintético contendo selênio utilizando a *P. stutzeri* isolada. Com *P. putida*, Avendãno *et al.* (2016) obtiveram redução de, aproximadamente, 89% em 15 h de incubação, utilizando meio sintético contendo selênio.

Além do método analítico, a redução de selenito no meio pode ser indicada pela alteração da coloração do meio, constituindo uma característica da forma alotrópica de selênio (LORTIE *et al.*, 1992). De acordo com Kuroda *et al.* (2011), as partículas de selênio elementar ficam dispersas em volta das células bacterianas e sobre as mesmas, com um diâmetro menor que 200 nm, as quais são caracterizadas como nanopartículas.

A coloração alaranjada do meio observada na Figura 13, indica que a bactéria biossorveu o selenito do meio, reduzindo-o à selênio elementar, e foi percebida visualmente após 9 h de incubação para a *P. stutzeri* e 6 h de incubação para a *P. putida*, tanto em M2 quanto em M3.

Figura 13 – Coloração dos meios sintéticos nos ensaios M1, M2 e M3 nos tempos inicial (t_i) e final ($t_f = 27$ h) de cultivo de *P. stutzeri*

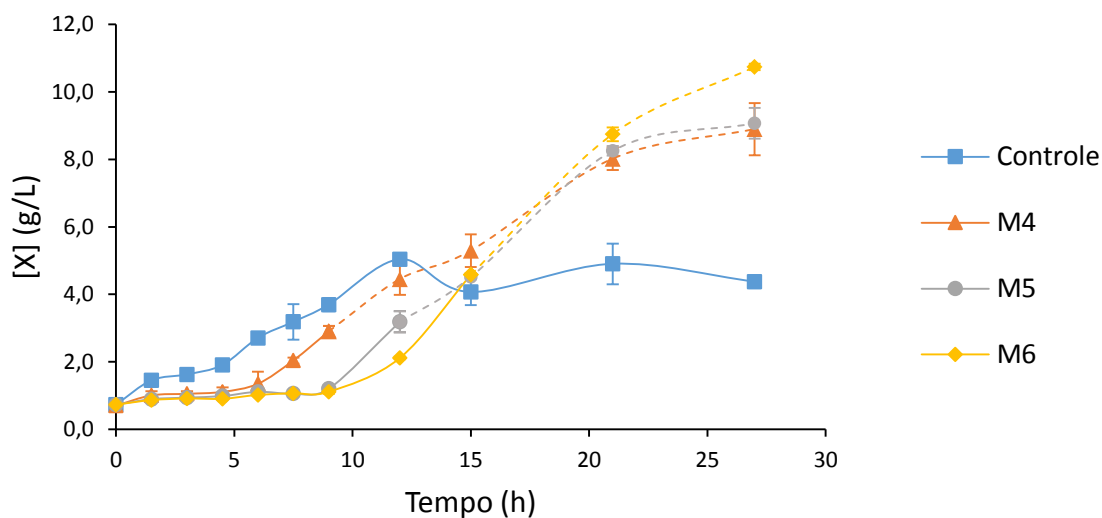


5.1.2. Determinação da concentração máxima tolerada

Para a determinação da concentração máxima de selenito em que há atividade metabólica de *P. stutzeri* e *P. putida*, foram analisadas, inicialmente, as concentrações de 50 mg/L (M4), 90 mg/L (M5) e 140 mg/L (M6).

O crescimento celular de *P. stutzeri* de cada ensaio (M4 à M6) é mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M4 (50 mg/L de selenito), M5 (90 mg/L de selenito) e M6 (140 mg/L de selenito) de *P. stutzeri*.

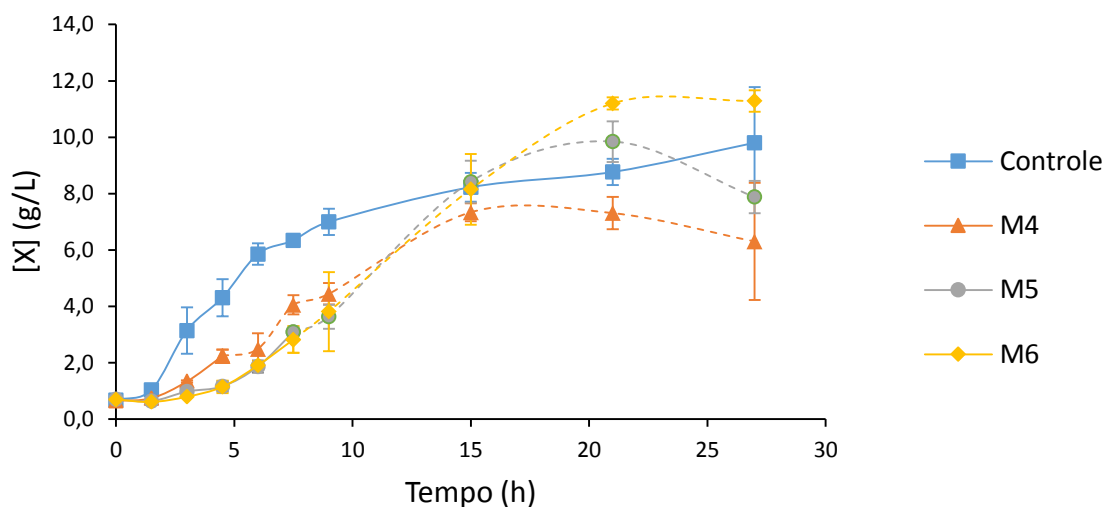


Pode-se observar na Figura 14 que a fase lag foi maior nas concentrações de 90 mg/L (M5) e 140 mg/L (M6). A alteração da coloração do meio foi observada primeiramente na concentração de 50 mg/L após 10 h de incubação, enquanto que para as concentrações de 90 mg/L e 140 mg/L, essa alteração foi somente visualizada após 12 h e 15 h, respectivamente.

Segundo Kuroda *et al.* (2011), *P. stutzeri* é capaz de reduzir, quase completamente, altas concentrações de selenito (até 1500 mg/L). No entanto, quanto maior a concentração de selenito, maior será a fase lag e mais lenta será a redução. Koren *et al.* (1992), relataram atividade dessa bactéria em concentrações superiores a 1500 mg/L de selenito.

No entanto, *P. putida* apresentou uma fase lag menor e início da alteração da coloração nos meios em tempo menor se comparado com *P. stutzeri*. As curvas de crescimento de *P. putida* nos meios M4 a M6 podem ser observadas na Figura 15.

Figura 15 – Crescimento celular nos ensaios em meio sintético M4 (50 mg/L de selenito), M5 (90 mg/L de selenito) e M6 (140 mg/L de selenito) de *P. putida*.



A alteração da coloração do meio foi observada primeiramente na concentração de 50 mg/L após 5 h de incubação, e para as concentrações de 90 mg/L e 140 mg/L, essa alteração foi visualizada após 8 h.

Assim como ocorrido com a *P. Stutzeri*, não houve inibição da atividade celular de *P. putida* nas concentrações de selenito analisadas. Porém, para ambas as bactérias se observou que quanto maior a concentração utilizada, maior o tempo para início da bio sorção de selenito do meio.

Tanto com *P. stutzeri* quanto com *P. putida*, a presença de selênio elementar interferiu na medida da absorbância das células bacterianas. Para tanto, antes da presença de selênio elementar ser visualizada (alteração da coloração do meio) os valores obtidos para a absorbância correspondem, somente, ao crescimento microbiano. Após isso o selênio interfere na medida, isto porque o selênio elementar é absorvido no comprimento de onda de aproximadamente 612 nm (KUMAR *et al.*, 2014) enquanto que a medida da absorbância das células bacterianas é de 600 nm.

Lortie *et al.* (1992) também encontraram esta mesma dificuldade e concluíram que, microscopicamente, as partículas de selênio formam cristais que tendem a se associar com alguns tipos de células bacterianas, enquanto outros permanecem livres no meio de cultura, o que dificulta a separação destes para mensurar o crescimento celular.

Dessa maneira, as linhas correspondentes ao crescimento celular dos gráficos representados nas Figuras 14 e 15 se apresentam tracejadas onde não é possível afirmar que os valores da absorvância correspondem ao crescimento celular.

Os resultados obtidos de concentração de selenito inicial (Se_i) e final (Se_f), a eficiência (R) e capacidade (Y) de bioissorção nos ensaios M4 a M6 com *P. stutzeri* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios em meio sintético de selenito (M4, M5, M6) de *P. stutzeri*. Tempo de cultivo (t_f) de 27 h.

Micro-organismo	Se_i planejada	Se_i real (mg/L)	Se_f (mg/L)	R (%)	Y (mg/g)
<i>P. stutzeri</i>	M4 (50 mg/L)	59,32	1,69	97,15	6,48
	M5 (90 mg/L)	108,62	36,38	66,50	7,96
	M6 (140 mg/L)	177,59	103,82	41,54	6,87

Como se pode observar houve redução da concentração de selenito nas soluções com 50 mg/L (M4), 90 mg/L (M5) e 140 mg/L (M6), com eficiência de bioissorção de 97,15%, 66,5% e 41,54%, respectivamente. Os valores de capacidade de bioissorção se apresentaram em torno de 6,48 mg/g e 7,96 mg/g.

Com o aumento da concentração de selenito no meio, percebe-se uma menor bioissorção pela bactéria em $t_f = 27$ h. Para aumentar a eficiência de bioissorção neste caso, pode ser sugerido um período maior de contato entre o bioissorvente e sorbato ou a renovação de células no meio, com proposta de um sistema semi-contínuo com recirculação de células.

Na Tabela 4 estão descritos os resultados obtidos por *P. putida*.

Tabela 4 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios em meio sintético de selenito (M4, M5, M6) de *P. putida*. Tempo de cultivo (t_i) de 27 h.

Micro-organismo	Se_i planejada	Se_i real (mg/L)	Se_f (mg/L)	R (%)	Y (mg/g)
<i>P. putida</i>	M4 (50 mg/L)	52,66	5,83	88,93	7,43
	M5 (90 mg/L)	88,1	6,43	92,70	10,36
	M6 (140 mg/L)	138,77	5,86	95,77	11,77

Como pode ser observado, houve uma drástica redução da concentração de selenito nos ensaios M4 (50 mg/L), M5 (90 mg/L) e M6 (140 mg/L), com eficiência de bioissorção de 88,93%, 92,75% e 95,78%, respectivamente. Além disso, *P. putida* obteve capacidade de bioissorção na ordem de 7,43 mg/g (M4), 10,36 mg/g (M5) e 11,77 mg/g (M6).

Posteriormente, foram realizados ensaios com concentrações de 500 mg/L (M7), 1000 mg/L (M8) e 1500 mg/L (M9) de selenito.

Os resultados obtidos de concentração de selenito inicial (Se_i) e final (Se_f), a eficiência (R) e capacidade (Y) de bioissorção nos ensaios M7 a M9 com *P. stutzeri* são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total e eficiência de bioissorção (R) em meio sintético de selenito (M7, M8, M9) de *P. stutzeri*. Tempos de cultivo (t_i) de 24 h e 48 h.

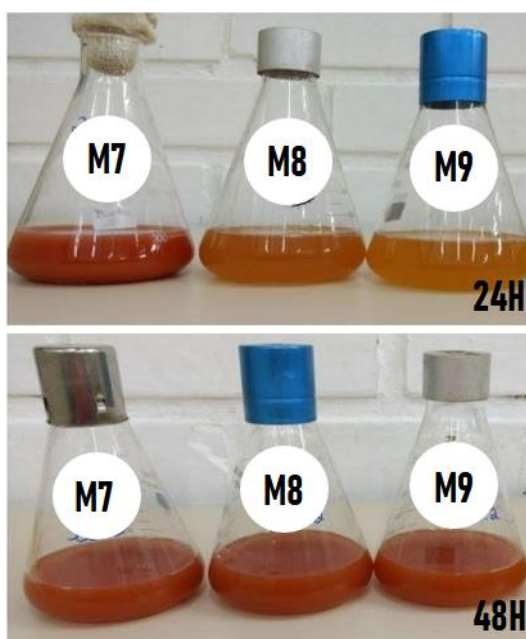
Se_i planejada	Se_i real (mg/L)	Se_{24h} (mg/L)	R_{24h} (%)	Se_{48h} (mg/L)	R_{48h} (%)
M7 (500 mg/L)	596,38	555,49	6,85	525,47	11,89
M8 (1000 mg/L)	1206,64	1198,57	0,67	1129,23	6,41
M9 (1500 mg/L)	1664,99	1662,85	0,13	1658,10	0,41

Para *P. stutzeri*, os valores de eficiência de bioissorção após 24 h de cultivo (R_{24h}) para as concentrações de 500 mg/L (M7), 1000 mg/L (M8) e 1500 mg/L (M9) foram de 6,85%, 0,67% e 0,13%, respectivamente; enquanto que, em 48 h de cultivo, a eficiência (R_{48h}) foi de 11,89%, 6,41% e 0,41%, respectivamente (Tabela 5).

Como o comportamento do crescimento bacteriano não foi acompanhado para os ensaios M7 a M9, não se pôde obter a capacidade de bioissorção (Y).

As colorações dos meios nos ensaios M7 a M9 após 24 h e 48 h de cultivo de *P. stutzeri* podem ser observadas na Figura 16.

Figura 16 – Coloração dos meios nos ensaios M7, M8 e M9 em 24 h e 48 h de cultivo de *P. stutzeri*.



Comparando os resultados da Tabela 5 e a Figura 16, com 24 h de cultivo pode-se afirmar que o ensaio M7 (500 mg/L) obteve maior eficiência de bioissorção ($R_{24h} = 6,85\%$), o que é afirmado pela intensa coloração avermelhada do meio. Para os ensaios M8 (1000 mg/L) e M9 (1500 mg/L), *P. stutzeri* apresentou menores valores de eficiência, o que justifica o fraco tom alaranjado dos meios. Em 48 h, mesmo com eficiências menores, não se pode afirmar que não houve bioissorção de selênio pela bactéria em M9 (1500 mg/L), por não se ter conhecimento da capacidade de bioissorção (Y) de *P. stutzeri* nessa concentração de selenito. Isso justifica a coloração visualmente semelhante obtida nos ensaios M7 a M9 após 48 h de cultivo (Figura 16).

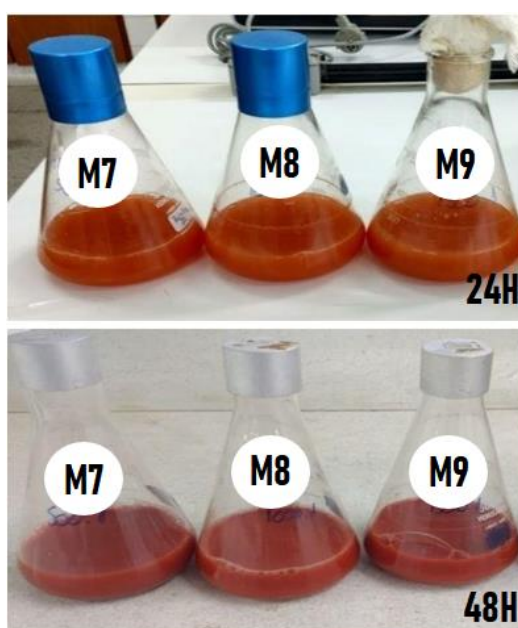
Resultados bem diferentes foram observados por Kuroda *et al.* (2011) e Lortie *et al.* (1992). Os primeiros autores relataram que *P. stutzeri* reduziu quase que completamente concentrações de 700 mg/L em 20 h; enquanto que Lortie *et al.* (1992) afirmaram que para uma concentração de 400 mg/L, 79% de selenito foi transformado em selênio elementar após 24 h de cultivo por *P. stutzeri* isolada.

Comportamento diferente do que ocorreu com *P. stutzeri* ao empregar maiores valores de Se_i foi apresentado pelo cultivo de *P. putida* para os mesmos tipos de meios (M7 a M9), conforme mostrado na Tabela 6 e Figura 17.

Tabela 6 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total e eficiência de biossorção (R) em meio sintético de selenito (M7, M8, M9) de *P. putida*. Tempos de cultivo (t_i) de 24 h e 48 h.

Se_i planejada	Se_i real (mg/L)	Se_{24h} (mg/L)	R_{24h} (%)	Se_{48h} (mg/L)	R_{48h} (%)
M7 (500 mg/L)	505,70	446,16	11,77	250,77	50,41
M8 (1000 mg/L)	1244,97	1131,95	9,08	854,73	31,34
M9 (1500 mg/L)	1522,94	1467,85	3,62	1391,76	8,61

Figura 17 – Coloração dos meios nos ensaios M7, M8 e M9 em 24 h e 48 h de cultivo de *P. putida*.



A partir dos valores de Se_i real e Se_f analiticamente determinados descritos na Tabela 6, foram calculados para o cultivo de *P. putida* em M7, M8 e M9 valores de R_{24h} (após 24 h de incubação) da ordem de 11,77%, 9,08% e 3,62%, respectivamente. Após 48 h de cultivo, os respectivos valores (R_{48h}) aumentaram para 50,41%, 31,34% e 8,61%.

Diferentemente do ocorrido com *P. stutzeri*, após 24 h de cultivo todos os meios com as concentrações de 500 mg/L (M7), 1000 mg/L (M8) e 1500 mg/L (M9) já apresentaram coloração alaranjada, a qual se intensificou após 48 h de cultivo.

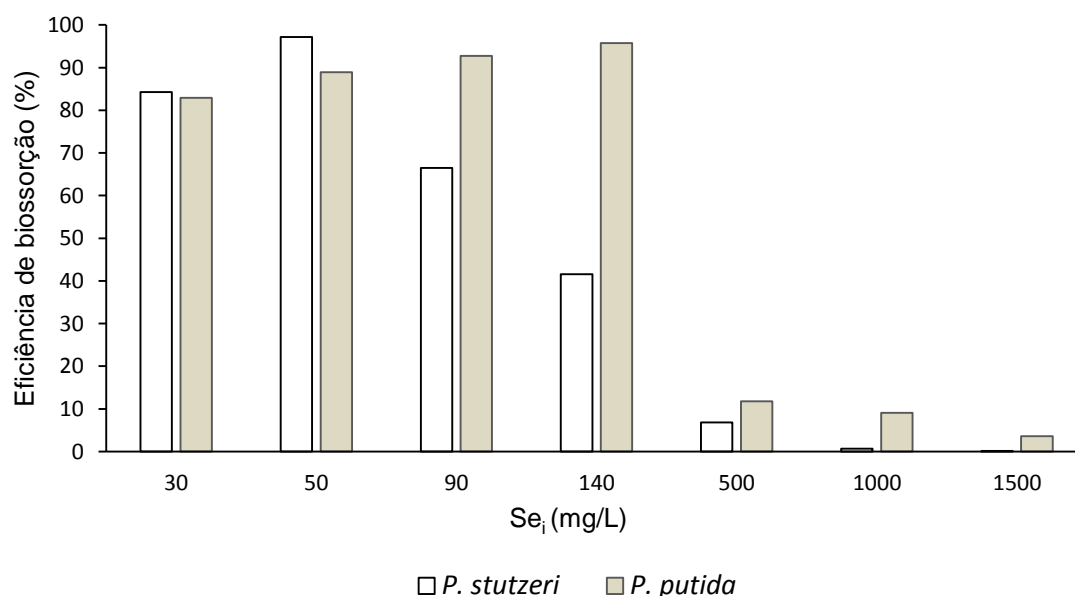
A partir disso, constata-se que a concentração máxima de selenito suportada por *P. putida* pode ser superior a 1500 mg/L. Isso corrobora com os resultados obtidos por Avendaño *et al.* (2016), onde *P. putida* apresenta atividade efetiva em concentrações maiores que 1700 mg/L em 48 h de cultivo.

Em resumo, dos resultados das diferentes concentrações de selenito testadas, *P. stutzeri* e *P. putida* apresentaram redução de selenito semelhante para concentrações de 30 e 50 mg/L. No entanto, para concentrações acima de 50 mg/L, *P. stutzeri* mostrou-se mais sensível do que *P. putida*.

A redução apresentada por *P. putida* foi praticamente constante até a concentração de 140 mg/L. Somente a partir da concentração de 500 mg/L, essa bactéria apresentou drástica diminuição na redução de selenito. Enquanto que, na concentração de 90 mg/L, *P. stutzeri* já apresentou uma queda na redução de, aproximadamente, 30%. Conforme Lortie *et al.* (1992), a alta toxicidade do íon selenito pode ser responsável pela baixa bioabsorção em meios com maiores concentrações de selenito.

A fim de apresentar uma melhor comparação de todos os ensaios de cultivo em meio sintético das bactérias utilizadas nos experimentos de bioabsorção de selênio, até $t_f = 24$ h, apresenta-se a Figura 18.

Figura 18 – Eficiência de bioabsorção de selênio (R) de *P. stutzeri* e *P. putida* cultivadas em meio sintético ($t_f = 24$ h) com diferentes concentrações iniciais de selenito (Se_i).



5.2. Tratamento biológico do efluente industrial

5.2.1. Caracterização do efluente industrial

Para a caracterização do efluente industrial cedido pela indústria química foram analisados os parâmetros de pH, salinidade, DQO e DBO₅, mostrados na Tabela 7. A determinação de outros compostos químicos, além dos de selênio, não foram autorizados pela empresa que forneceu este efluente.

Tabela 7 - Caracterização do efluente industrial (pH, salinidade, DBO₅ e DQO) nas concentrações de 30 mg/L, 268 mg/L e 927 mg/L de selênio total.

Selênio total	Parâmetro	Resultado
30 mg/L	pH	2,18 ± 0,04
	Salinidade (%)	23,3 ± 2,9
	DQO (mg/L)	316,0 ± 2,6
	DBO ₅ (mg/L)	29,6 ± 1,9
268 mg/L	pH	2,08 ± 0,03
	Salinidade (%)	9,7 ± 0,6
	DQO (mg/L)	465,3 ± 2,5
	DBO ₅ (mg/L)	2,2 ± 0,5
927 mg/L	pH	3,32 ± 0,04
	Salinidade (%)	6,3 ± 0,6
	DQO (mg/L)	582,3 ± 2,3
	DBO ₅ (mg/L)	9,1 ± 0,7

O efluente industrial apresentou característica ácida e alto nível de salinidade, principalmente para a condição de menor concentração de Se. Os diferentes valores de salinidade observados no efluente foram devidos às etapas de tratamento químico que a empresa faz com ditionito de sódio (Na₂S₂O₄) visando recuperar parte do composto de selênio na corrente destinada à ETE. De acordo com He *et al.* (2016), efluentes que contêm mais de 3,5% em massa de salinidade são considerados hipersalinos.

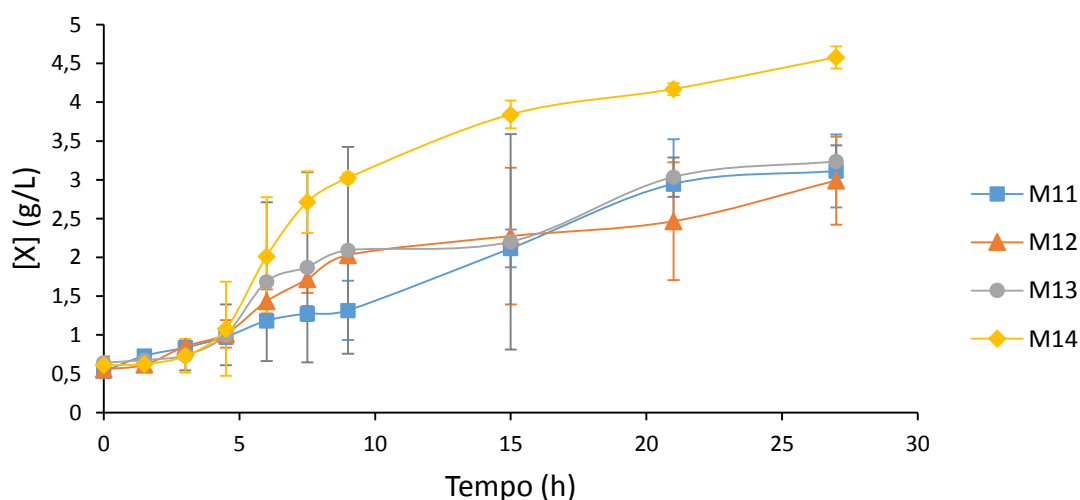
A relação DQO/DBO₅ de 10,67 (Se = 30 mg/L), 211,5 (Se = 268 mg/L) e 63,99 (Se = 927 mg/L) confere característica inorgânica ao efluente. Conforme Von Sperling (1995), o efluente é classificado como de baixa biodegradabilidade quando possui relação DQO/DBO₅ superior a 3,5.

5.2.2. Ensaio de biossorção com efluente industrial

O crescimento celular de *P. stutzeri* foi analisado em meios contendo efluente industrial: M11 (30 mg/L de selenito), M12 (30 mg/L de selenito + 5 g/L de glicose), M13 (30 mg/L de selenito + 5 g/L de glicose + 8 g/L de caldo nutriente) e M14 (30 mg/L de selenito + 8 g/L de caldo nutriente).

Os resultados obtidos do crescimento celular de *P. stutzeri* utilizando esses meios (M11, M12, M13 e M14) podem ser observados na Figura 19.

Figura 19 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M11 (30 mg/L de selenito), M12 (30 mg/L de selenito e glicose), M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) e M14 (30 mg/L de selenito e caldo nutriente) de *P. stutzeri*.

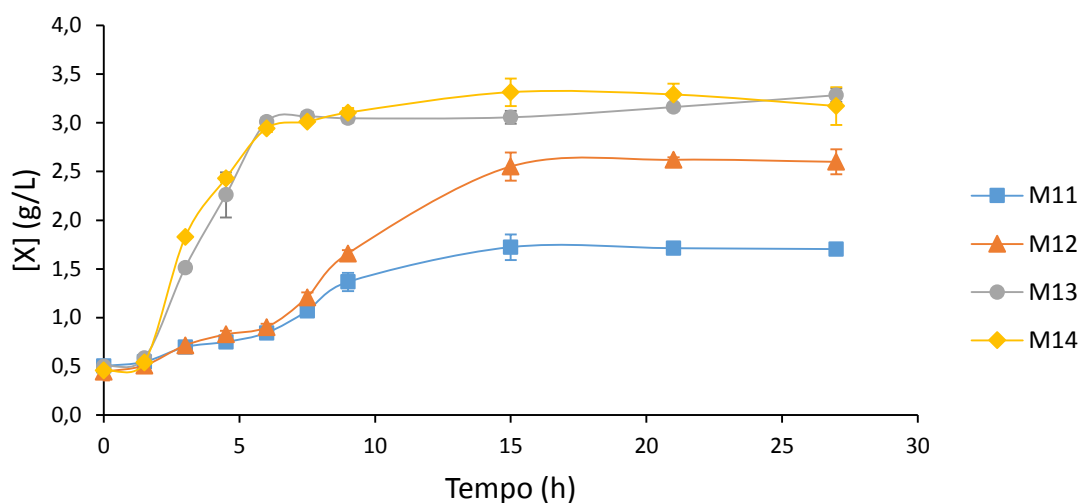


De acordo com a Figura 19, a partir de 5 h de cultivo *P. stutzeri* apresentou diferentes curvas de crescimento celular para os diferentes meios, sendo que no ensaio M14 a bactéria apresentou maior concentração celular ao final do experimento ($4,57 \pm 0,14$ g/L). No entanto, após 27 h de cultivo, *P. stutzeri* ainda

não havia alcançado a fase estacionária nos ensaios M12 e M14, não podendo ser afirmado para os ensaios M11 e M13, os quais apresentam um possível início dessa fase.

Nos ensaios com *P. putida*, o crescimento celular para cada meio de cultivo (M11 a M14) é mostrado na Figura 20.

Figura 20 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M11 (30 mg/L de selenito), M12 (30 mg/L de selenito e glicose), M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) e M14 (30 mg/L de selenito e caldo nutriente) de *P. putida*.



Como podemos observar, as curvas de crescimento celular de *P. putida* nos ensaios M13 e M14 foram semelhantes, sendo que a fase log iniciou logo após 1,5 h de cultivo, com término em 6 h. Enquanto que nos ensaios M11 e M12, as curvas de crescimento celular foram semelhantes até 7,5 h de cultivo. Após esse período, M12 apresentou uma fase log mais acentuada em comparação ao M11, porém a fase estacionária para os dois meios iniciou em 15 h de cultivo.

Verifica-se que o caldo nutriente nos meios, tanto com presença ou não de glicose, pode ter acelerado a atividade celular de *P. putida*. Além disso, também não houve influência da presença de glicose sobre o crescimento de *P. stutzeri*.

Ambas as bactérias consumiram o substrato adicionado nos meios M12 e M13. O consumo de glicose por *P. stutzeri* e *P. putida* pode ser observado nas Figura 21 e 22, respectivamente.

Figura 21 – Consumo de glicose nos ensaios com efluente industrial M12 (30 mg/L de selenito e glicose) e M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) por *P. stutzeri*.

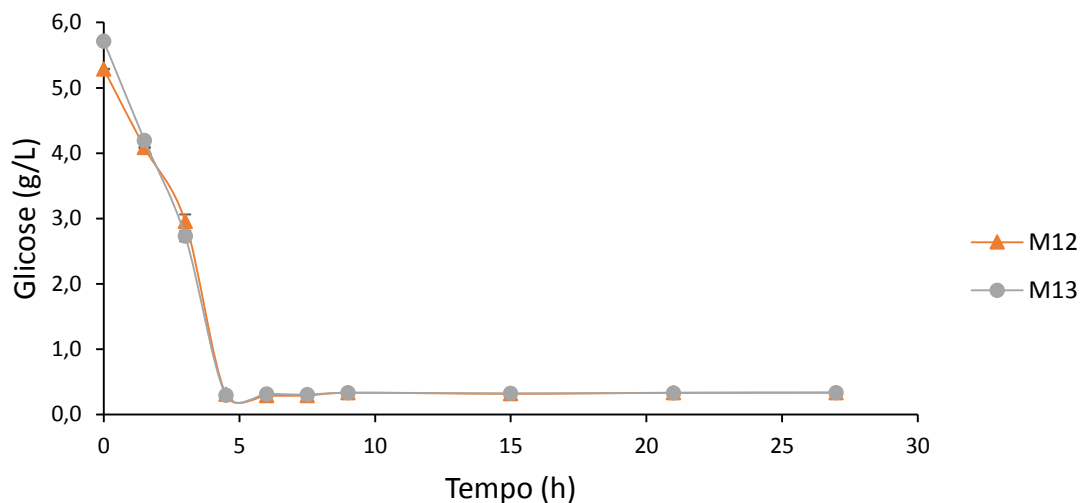
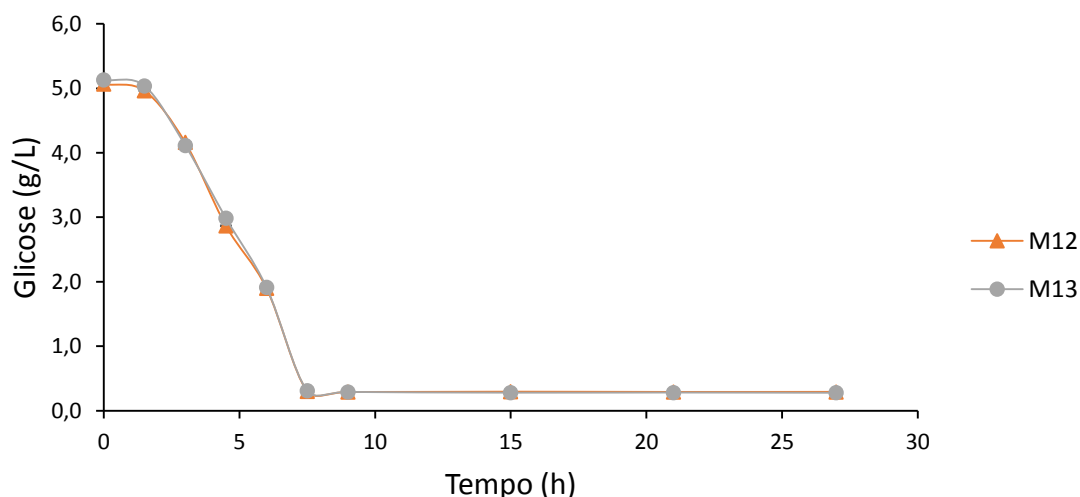


Figura 22 – Consumo de glicose nos ensaios com efluente industrial M12 (30 mg/L de selenito e glicose) e M13 (30 mg/L de selenito, glicose e caldo nutriente) por *P. putida*.



Conforme as Figuras 21 e 22, a glicose foi consumida em apenas 4,5 h por *P. stutzeri* e 7,5 h por *P. putida*, respectivamente. Estes tempos de cultivo foram menores do que aqueles observados com o meio sintético. Isto ocorreu em função do uso de menor concentração inicial de glicose em M12 e M13 em comparação à M1 e M3, respectivamente. As velocidades globais de consumo de glicose ($\vartheta_G = \Delta G/\Delta t$) dos dois micro-organismos nos meios de cultivo sintéticos ($\vartheta_{G,P.stutzeri} \approx 1,08 \pm 0,07$ g/L.h , $\vartheta_{G,P.putida} \approx 0,50 \pm 0,07$ g/L.h) foram próximos das velocidades estimadas nos meios com efluente contendo 30 mg/L de selênio total ($\vartheta_{G,P.stutzeri} \approx 1,27 \pm 0,05$ g/L.h , $\vartheta_{G,P.putida} \approx 0,68 \pm 0,02$ g/L.h). O consumo imediato de glicose

indica que esta pode ser a fonte de carbono mais acessível pelos micro-organismos no meio contendo efluente industrial.

A análise de glicose também foi realizada para os meios sem a adição desse substrato em função do efluente possuir substâncias desconhecidas (segredo industrial) que podem interferir no crescimento celular. No entanto, não se constatou presença desse açúcar no efluente industrial.

As concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selenito, após 27 h de cultivo, e a eficiência de bioissorção das bactérias *P. stutzeri* e *P. putida*, são apresentadas nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial a 30 mg/L de selenito (M11, M12, M13 e M14) de *P. stutzeri*.

Meio	Se_i (mg/L)	Se_f (mg/L)	R (%)	Y (mg/g)
M11 (efluente)	27,57	27,23	1,23	0,13
M12 (efluente e glicose)	27,6	27,49	0,40	0,05
M13 (efluente, glicose e YE*)	27,88	25,9	7,10	0,76
M14 (efluente e YE*)	26,42	26,24	0,68	0,05

*YE: caldo nutriente.

Tabela 9 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial a 30 mg/L de selenito (M11, M12, M13 e M14) de *P. putida*.

Meio	Se_i (mg/L)	Se_f (mg/L)	R (%)	Y (mg/g)
M11 (efluente)	29,25	26,14	10,63	2,59
M12 (efluente e glicose)	28,19	27,28	3,23	0,42
M13 (efluente, glicose e YE*)	26,78	26,76	0,07	0,01
M14 (efluente e YE*)	26,75	26,41	1,27	0,13

*YE: caldo nutriente.

No ensaio M13 *P. stutzeri* apresentou maior eficiência de bioissorção de selenito (7,10%) em relação aos demais valores de redução: 1,23% em M11, 0,40% em M12 e 0,68% em M14. E a capacidade de bioissorção também foi maior no ensaio M13, com 0,76 mg/g (Tabela 8). Enquanto que para *P. putida*, a maior

eficiência obtida foi em M11 com 10,63%, seguido do ensaio M12 com 3,23%, M14 com 1,27% e de M13 com apenas 0,07%. Assim como a capacidade de bioadsorção se mostrou maior em M11, com 2,59 mg/g (Tabela 9). Percebe-se que as bactérias apresentaram eficiência e capacidade de bioadsorção melhores em diferentes meios, *P. stutzeri* em M13 (efluente, glicose e caldo nutriente) e *P. putida* em M11 (efluente).

A coloração dos meios não se alterou visualmente para os ensaios de *P. stutzeri* (Figura 23) e *P. putida* (Figura 24). Os meios M13 e M14 possuem coloração mais escura devido a presença de caldo nutriente no cultivo.

Figura 23 – Coloração dos meios nos ensaios M11, M12, M13 e M14 em 27 h de cultivo de *P. stutzeri*.

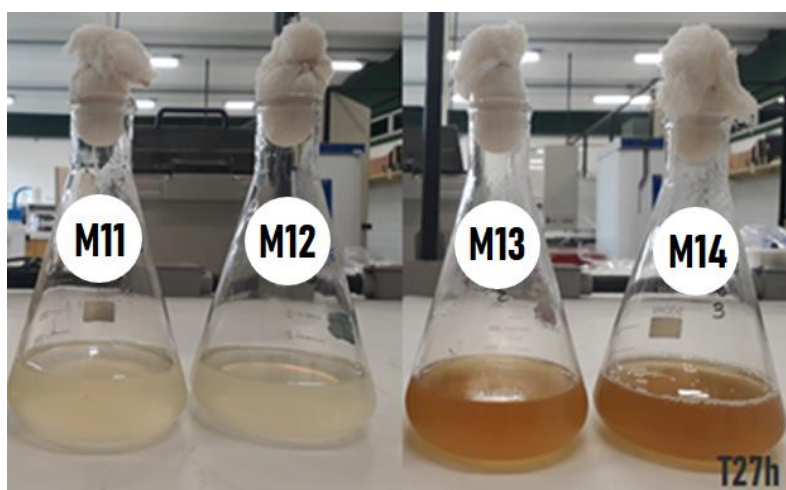
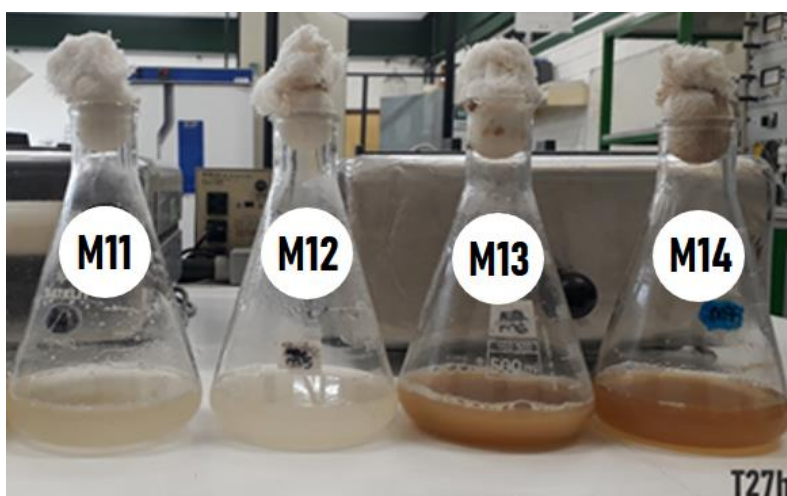


Figura 24 – Coloração dos meios nos ensaios M11, M12, M13 e M14 em 27 h de cultivo de *P. putida*.



Dessa forma, fica evidente a influência de substâncias contidas no efluente industrial que estão mais biodisponíveis ou que competem com o selenito de sódio (Na_2SeO_3). Além disso, conforme informação da indústria química, apenas é possível a espécie de selenito (SeO_3^{2-}) no efluente, descartando-se a possibilidade de outra espécie de selênio que poderia não estar biodisponível aos micro-organismos (selenetos inorgânicos e selênio elementar).

De acordo com Wang & Chen (2006), os efluentes industriais geralmente contêm vários componentes iônicos que podem promover um impacto, muitas vezes negativo, sobre a bioacumulação do elemento de interesse. Bueno *et al.* (2009) afirmam que esse efeito negativo é devido à competição de íons que se ligam aos sítios ativos da biomassa.

Como as fórmulas moleculares do selenito de sódio (Na_2SeO_3) e do ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) são diferenciadas apenas pela presença dos íons selênio e enxofre, respectivamente, resolveu-se estudar o comportamento microbiano das bactérias em efluente industrial com menor quantidade de ditionito de sódio, o qual é adicionado para promover a precipitação e redução de selênio residual.

Meyer (2017), caracterizou comunidades bacterianas e isolou micro-organismos presentes em estação de tratamento de efluentes, capazes de consumir enxofre, e identificou gêneros de *Pseudomonas* em algumas de suas amostragens. Lin *et al.* (2018), apontam que *Pseudomonas* são uma das espécies dos micro-organismos capazes de degradar compostos de enxofre. Dessa forma, fica evidente a capacidade de bio-sorção de enxofre pela espécie *Pseudomonas*.

A fim de verificar a influência do ditionito de sódio na eficiência e capacidade de bio-sorção, a indústria química cedeu o efluente em duas concentrações de selênio total: 268 mg/L e 927 mg/L. Conseqüentemente, os teores de ditionito de sódio se apresentam menores nessas condições em relação ao efluente com 30 mg/L de selênio total.

Foram testados dois diferentes meios para cada concentração: efluente contendo 268 mg/L de selenito (M15), efluente contendo 268 mg/L de selenito e caldo nutriente (M16), efluente contendo 927 mg/L de selenito (M17) e efluente contendo 927 mg/L de selenito e caldo nutriente (M18).

O crescimento celular de *P. stutzeri* e *P. putida* nos ensaios M15, M16, M17 e M18 pode ser observado nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

Figura 25 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de *P. stutzeri*.

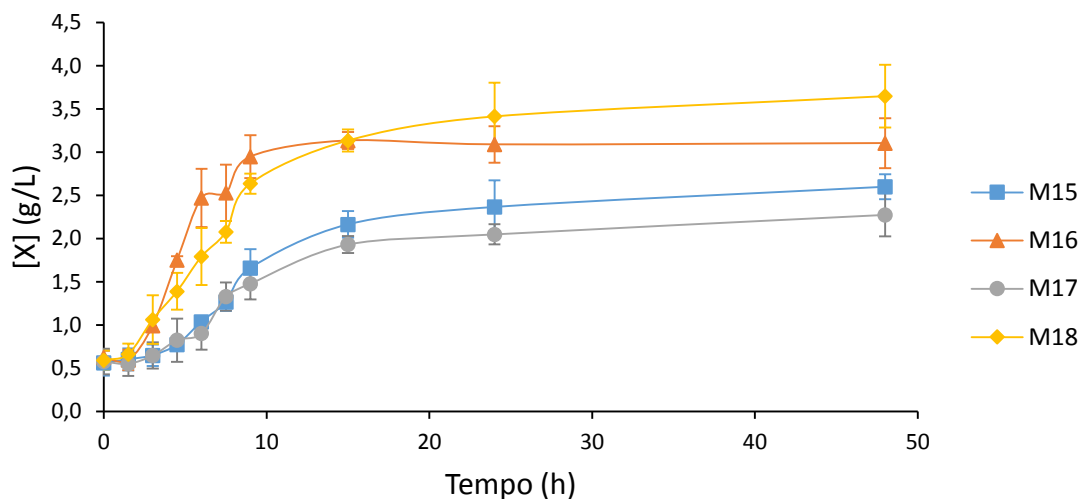
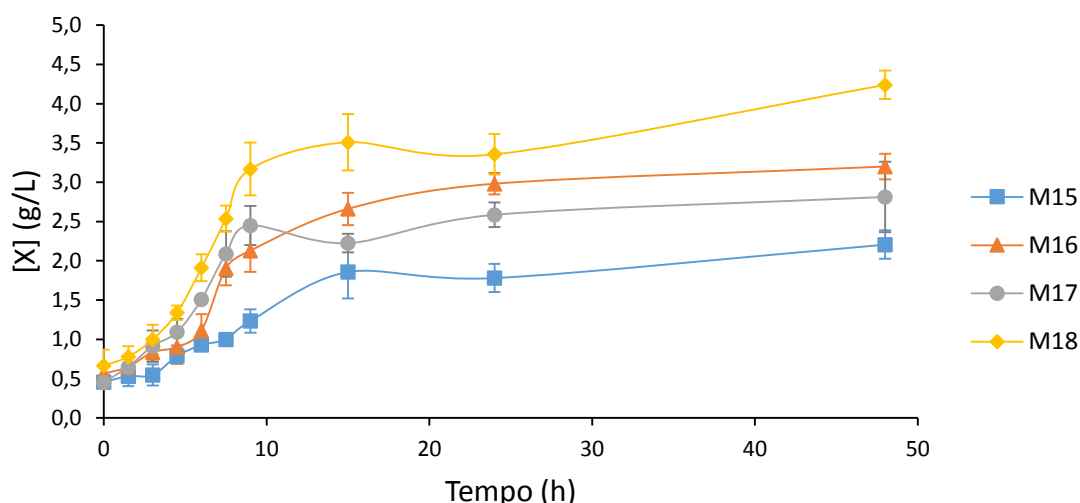


Figura 26 – Crescimento celular nos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de *P. putida*.



Para ambas as bactérias, entre um período de 10 à 24 h de cultivo, ocorre a diminuição da velocidade da atividade metabólica e as curvas de crescimento celular tendem a fase estacionária até 48 h.

Esse comportamento, também observado nos ensaios com efluente a 30 mg/L de selenito (com exceção dos ensaios M12 e M14 de *P. stutzeri*) pode estar relacionado com a quantidade elevada de sais presentes no efluente industrial.

Pereira (2012) e Almeida *et al.* (2013) indicam que a salinidade tem influência negativa sobre o crescimento de bactérias endofíticas estudadas (*Burkholderia gladioli* e *B. heleia*) na medida em que se aumenta os teores salinos dos meios de

cultivo. Kuroda *et al.* (2011) estudaram a influência de cloreto de sódio (NaCl) na bioissorção de selenito e selenato por *Pseudomonas stutzeri* NT-I isolada e concluíram que as eficiências de bioissorção reduziram com o aumento de NaCl.

A alta salinidade aumenta a pressão osmótica da célula, podendo romper a membrana celular, e ao mesmo tempo pode reduzir a atividade enzimática, destruindo a estrutura das enzimas microbianas e inibindo a crescimento de micro-organismos (HE *et al.*, 2016).

De acordo com Szymanska *et al.* (2019), *Pseudomonas stutzeri* é considerada uma bactéria halotolerante (tolera altas concentrações de NaCl). He *et al.* (2016) apontam que micro-organismos halotolerantes, sob a condição de uma certa concentração salina, podem acumular algumas moléculas pequenas na célula para resistir ao ambiente adverso. Essas pequenas moléculas incluem íon potássio, açúcares, álcoois, aminoácidos, ácidos e seus derivados, e possui funções de regulação do equilíbrio osmótico e estabilização da membrana celular.

As concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selenito, após 27 h de cultivo, a eficiência (R) e a capacidade (Y) de bioissorção nos ensaios com efluente industrial a 268 mg/L e 927 mg/L de selenito das bactérias *P. stutzeri* e *P. putida*, são apresentadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de *P. stutzeri*.

Ensaio	Se_i efluente	Se_i (mg/L)	Se_f (mg/L)	R (%)	Y (mg/g)
M15	268	190,61 ± 26,21	176,44 ± 18,72	7,23 ± 2,93	5,56 ± 3,52
M16		173,17 ± 22,07	157,57 ± 18,40	8,94 ± 0,98	6,67 ± 2,07
M17	927	745,17 ± 45,04	700,77 ± 46,70	5,98 ± 0,58	26,95 ± 6,55
M18		795,87 ± 110,17	709,34 ± 104,15	10,92 ± 0,76	27,18 ± 3,06

Tabela 11 – Concentrações inicial (Se_i) e final (Se_f) de selênio total, eficiência de bioissorção (R) e capacidade de bioissorção (Y) dos ensaios com efluente industrial M15 (268 mg/L de selenito), M16 (268 mg/L de selenito e caldo nutriente), M17 (927 mg/L de selenito) e M18 (927 mg/L de selenito e caldo nutriente) de *P. putida*.

Ensaio	Se_i efluente	Se_i (mg/L)	Se_f (mg/L)	R (%)	Y (mg/g)
M15	268	202,21 ± 3,25	196,15 ± 5,20	3,01 ± 1,01	3,66 ± 1,51
M16		255,62 ± 71,23	152,62 ± 17,11	38,85 ± 10,35	38,93 ± 21,52
M17	927	737,94 ± 43,40	689,61 ± 32,87	6,52 ± 1,04	23,00 ± 5,06
M18		679,38 ± 55,54	598,62 ± 32,12	11,79 ± 2,48	22,15 ± 6,25

Nos experimentos com *P. stutzeri* (Tabela 10) observa-se semelhança nos valores de eficiência (R) e capacidade de bioissorção (Y) obtidos entre os ensaios M15 e M16 ($R_{M15} = 7,23 \pm 2,93\%$ e $R_{M16} = 8,94 \pm 0,98\%$; $Y_{M15} = 5,56 \pm 3,52$ mg/g e $Y_{M16} = 6,67 \pm 2,07$ mg/g). Nos demais ensaios, os valores de Y também se mantiveram semelhantes (26,95 ± 6,55 mg/g em M17 e 27,18 ± 3,06 mg/g em M18), diferentemente dos valores de R, que não foram semelhantes para esses ensaios (5,98 ± 0,58% em M17 e 10,92 ± 0,76% em M18).

Com *P. putida*, destaca-se o ensaio M16, no qual a bactéria conseguiu uma eficiência de 38,85 ± 10,35%, enquanto que nos demais ensaios obteve R na ordem de 3,01 ± 1,01% em M15, 6,52 ± 1,04% em M17 e 11,79 ± 2,48% em M18. A capacidade de bioissorção não variou muito nos ensaios M16 a M18 ($Y_{M16} = 38,93 \pm 21,52$ mg/g, $Y_{M17} = 23,00 \pm 5,06$ mg/g e $Y_{M18} = 22,15 \pm 6,25$ mg/g), apenas em M15 com 3,66 ± 1,51 mg/L.

Nota-se que a suposição levantada sobre a competitividade de íons pode ser válida para o ditonito de sódio ($Na_2S_2O_4$), visto que os resultados apresentaram uma melhora na eficiência e, principalmente, na capacidade de bioissorção de selenito em relação aos ensaios com efluente industrial na concentração de 30 mg/L de selênio para ambas as bactérias. Porém, os valores de R e Y ainda se apresentam menores em relação aos obtidos com meio sintético contendo selenito de sódio.

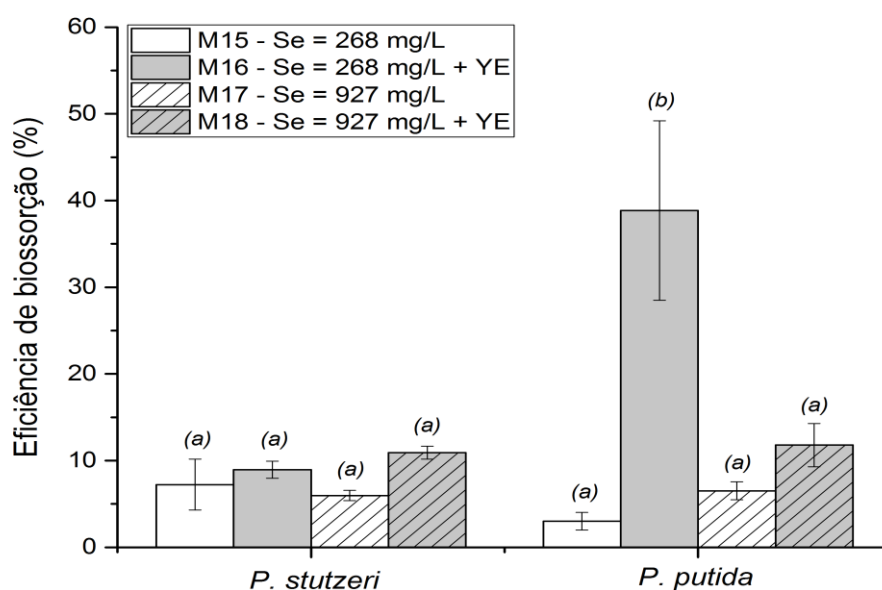
Wang & Chen (2006) relatam que em estudos sobre a competitividade de íons chumbo (Pb) e cromo (Cr) em solução, no processo de bioissorção por *S.*

cerevisiae, a levedura possui maior afinidade, seletividade e capacidade de bioabsorção para Pb do que para Cr.

Bueno *et al.* (2009), realizaram estudos com *Rhodococcus opacus* e constataram que a capacidade de bioabsorção dos íons Pb é reduzida em 48,7% na presença de íons Cr e em 56,9% na presença de íons Cr e Cobre (Cu). Segundo os autores, isso pode estar relacionado com a interação química entre os metais analisados ou entre os metais e a biomassa na competição pelos sítios ativos na superfície da célula microbiana.

Os resultados de eficiência e capacidade de bioabsorção foram analisados estatisticamente. O gráfico referente a análise estatística da eficiência de bioabsorção dos ensaios M15 a M18 de *P. stutzeri* e *P. putida* é apresentado na Figura 27.

Figura 27 – Eficiência de bioabsorção (R) dos ensaios com efluente industrial M15, M16, M17 e M18 no cultivo de *P. stutzeri* e *P. putida*.



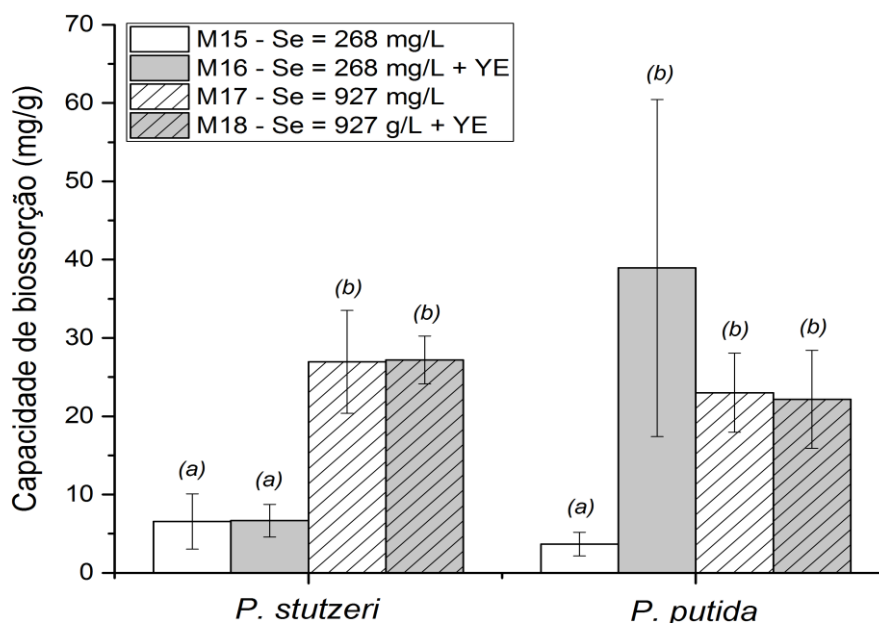
Letras iguais significam que não há diferença significativa entre os valores de R (%) de acordo com o teste de Tukey para $p < 0,05$.

De acordo com a Figura 27, pode-se verificar que o ensaio M16 com *P. putida* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros ensaios com as duas bactérias. Pode-se afirmar, sem comparar às restrições legais aplicáveis, que a melhor condição de tratamento do efluente industrial para redução

de selenito, dentre as condições realizadas neste estudo, é o meio contendo Se_i de 268 mg/L adicionado de caldo nutriente com a bactéria *P. putida*.

O gráfico referente a análise estatística da capacidade de bioSORÇÃO (Y) dos ensaios M15 a M18 de *P. stutzeri* e *P. putida* é apresentado na Figura 28.

Figura 28 – Capacidade de bioSORÇÃO (Y) dos ensaios com efluente industrial M15, M16, M17 e M18 no cultivo de *P. stutzeri* e *P. putida*.



Letras iguais significam que não há diferença significativa entre os valores de R (%) de acordo com o teste de Tukey para $p < 0,05$.

Na Figura 28, pode-se verificar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios M17 e M18 de *P. stutzeri* e M16, M17 e M18 de *P. putida*, os quais destacam-se pelos melhores valores de Y em comparação com os demais ensaios analisados. Conclui-se que a presença de caldo nutriente no meio de cultivo aumenta a capacidade de bioSORÇÃO pelas bactérias, exceto para o meio M16 de *P. putida* no qual não foi adicionado esse nutriente.

Conforme ambos os resultados analisados estatisticamente (Figuras 27 e 28), possivelmente os teores de ditionito de sódio e a concentração de 268 mg/L de selenito no meio foram favoráveis para o processo de bioSORÇÃO de *P. putida*.

As colorações dos meios M15 a M18, após 48 h de cultivo, para *P. stutzeri* e *P. putida* podem ser observadas nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

Figura 29 – Coloração dos meios nos ensaios M15, M16, M17 e M18 em 48 h de cultivo de *P. stutzeri*.

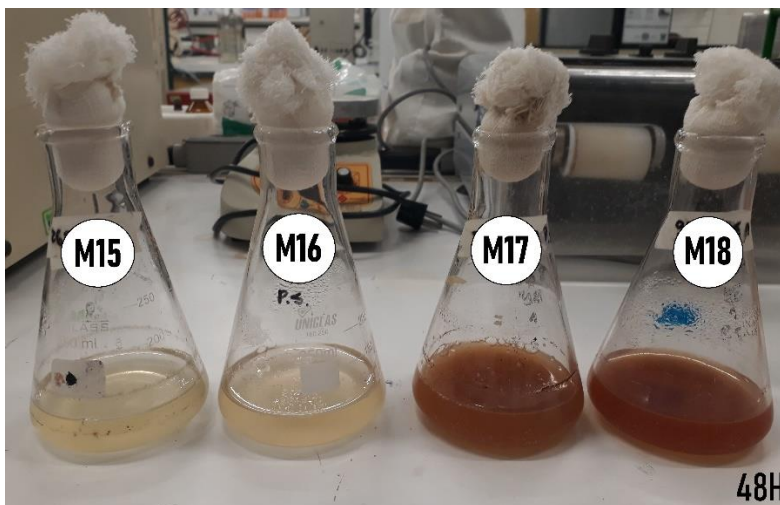
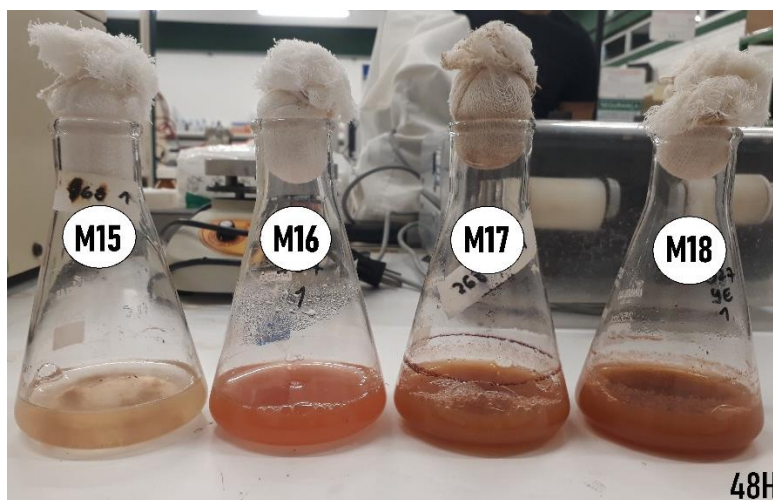


Figura 30 – Coloração dos meios nos ensaios M15, M16, M17 e M18 em 48 h de cultivo de *P. putida*.



Conforme as Figuras 29 e 30, a alteração visual na coloração foi observada no meio M16 de *P. putida* (Figura 28), confirmando assim que esse micro-organismo, nessa condição, obteve a melhor eficiência de biossorção.

Entretanto, nenhuma das concentrações finais de selênio total (Se_f) no efluente industrial alcançadas pelos tratamentos biológicos deste estudo atende a legislação ambiental mais restritiva, Lei nº 14.675/2009 de Santa Catarina.

5.3. Testes de toxicidade aguda

Os resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras contendo solução sintética de selenito de sódio a 30 mg/L não-tratada (T1) e pós-tratamento (T2), efluente industrial com 30 mg/L de selenito não-tratado (T3) e pós-tratamento (T4), com *Daphnia magna*, são apresentados na Tabela 12.

As composições dos meios sintético e do efluente foram os mesmos dos ensaios M2+ e M13, respectivamente, com uso da bactéria *P. putida*.

Tabela 12 – Testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* em diferentes fatores de diluição (%) para os meios T1 e T2 (conforme M2) e T3 e T4 (conforme M13) tratados por *P. putida*.

Amostra	Fator de diluição (%)	Nº de organismos-teste mortos/imobilizados nos ensaios em quadruplicata			
T1 (solução sintética não-tratada)	50	5	5	5	5
	25	5	5	5	5
	10	4	3	2	2
	1	2	1	0	1
CE_{50%} (T1)		5,68%			
T2 (solução sintética pós-tratamento)	50	5	5	5	5
	25	5	5	5	5
	10	1	2	2	2
	1	0	0	0	0
CE_{50%} (T2)		9%			
T3 (efluente industrial não-tratado)	50	5	5	5	5
	25	5	5	5	5
	10	3	2	4	0
	1	0	0	0	0
CE_{50%} (T3)		7,66%			
T4 (efluente industrial pós-tratamento)	50	5	5	5	5
	25	5	5	5	5
	10	2	1	0	2
	1	0	0	0	0
CE_{50%} (T4)		10,57%			

De acordo com a Tabela 12, todos os testes realizados com fator de diluição 2, ou seja, 50% de diluição da amostra, não atendem ao fator de diluição (FDd = 2) estabelecido para a categoria de indústria química pela Tabela 1 do anexo da Portaria nº 017/2002 (Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina – IMA), no qual não mais se observe efeitos tóxicos agudos aos organismos-teste. Isso porque,

nesse mesmo fator de diluição, todos os organismos-teste apresentaram mortalidade em 48h.

Mesmo resultado foi obtido por Spitzner (2013) que estudou a toxicidade de misturas, por *Mysidopsis juniae*, em amostras de efluente coletadas na mesma indústria química, nos setores de produção com cobalto e iodo, sendo que a linha produtiva de iodo apresentou concentração de Se = 34,77 mg/L.

Também foram avaliadas estatisticamente as concentrações efetivas em 50% das amostras ($CE_{50\%}$) para todos os testes com base nas diluições de 50%, 25%, 10% e 1%. Conforme a Tabela 12, a $CE_{50\%}$ de cada teste foi de 5,68% (T1), 9% (T2), 7,66% (T3) e 10,57% (T4). Isso significa que, para as amostras analisadas não apresentarem efeito tóxico em 50% dos microcrustáceos no meio ambiente, esses valores correspondem ao percentual de solução ou efluente para lançamento no corpo hídrico.

6. CONCLUSÕES

A presença de selenito, tanto nos meios de solução sintética quanto nos meios de efluente industrial, não inibiu o crescimento celular e o consumo de substrato (glicose) das bactérias *P. stutzeri* e *P. putida*. Porém, descartou-se a necessidade de adição dessa fonte de carbono por, aparentemente, não influenciar na bio sorção de selenito, mesmo o efluente apresentando baixa biodegradabilidade ($DQO/DBO_5 \gg 3,5$).

Com o aumento de selenito no meio de cultivo sintético, *P. stutzeri* mostrou ser mais sensível que *P. putida* até concentrações de $Se_i = 140$ mg/L. Para $Se_i \geq 500$ mg/L, ambas as bactérias apresentaram drástica redução de eficiência na bio sorção. No entanto, as capacidades de bio sorção se mantiveram semelhantes.

Para tratamento biológico do meio sintético com eficiências de bio sorção de selenito maiores que 85%, as composições de meio recomendadas para *P. stutzeri* são M2 (30 mg/L de selenito de sódio + 8 g/L de caldo nutriente) e M4 (50 mg/L de selenito de sódio + 8 g/L de caldo nutriente); e para *P. putida* sugere-se, além dos meios M2 e M4, o M5 (90 mg/L de selenito de sódio + 8 g/L de caldo nutriente) e M6 (140 mg/L de selenito de sódio + 8 g/L de caldo nutriente).

Nos ensaios com efluente industrial, nenhum dos resultados obtidos atenderam as concentrações máximas permitidas para lançamento em corpos hídricos pela legislação ambiental vigente ($Se \leq 30$ mg/L pela Resolução CONAMA nº 430/2011 e $Se \leq 0,02$ mg/L pela Lei Estadual nº 14.675/2009 de Santa Catarina). No entanto, destaca-se a bactéria *P. putida* no ensaio M16 (268 mg/L de selenito + 8 g/L de caldo nutriente), que obteve a maior eficiência e capacidade de bio sorção ($R = 38,85 \pm 10,35\%$ e $Y = 38,93 \pm 21,52$ mg/g) com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais ensaios realizados com efluente industrial. Os teores salinos de $9,7 \pm 0,6\%$ devido ao uso de ditionito de sódio no tratamento químico, na concentração de 268 mg/L de selenito e a adição de nutrientes podem ter contribuído no processo de bio sorção de selênio de *P. putida*.

Com a análise toxicológica dos meios sintéticos e do efluente industrial ($Se_i = 30 \text{ mg/L}$) pré e pós tratamento biológico por *P. putida*, nenhum dos testes realizados atende ao fator de diluição ($FDd = 2$) estabelecido pela Portaria nº 017/2002 do IMA. Para lançamento em corpos hídricos, a concentração do efluente industrial tratado deve ser a correspondente ao percentual obtido na $CE_{50\%}$ (10,57%).

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para complementação dos resultados obtidos neste trabalho e contribuir para o tratamento do efluente industrial, sugere-se:

- Avaliar a eficiência e a capacidade de bioissorção de selenito por *P. stutzeri* e *P. putida* em condições aeróbicas, sem restrição de oxigênio, para as mesmas composições e concentrações de Se_i utilizadas neste trabalho.
- Avaliar outro modo operacional do processo de bioissorção para o tratamento do efluente industrial, como o processo semi-contínuo (batelada alimentada), visando o aumento da eficiência de bioissorção do selênio.
- Pesquisar e analisar, juntamente com a empresa geradora do efluente industrial, alternativas de pré-tratamento químico para redução de selênio total, visando a diminuição da salinidade do efluente e a competitividade de íons provocada pelo uso de ditionito de sódio.

8. REFERÊNCIAS

ABNT NBR 12713:2016. **Ecotoxicologia aquática** – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera).

ADIO, S. O.; OMAR, M. H.; ASIF, M.; SALEH, T.A. Arsenic and Selenium removal from water using Biosynthesized Nanoscale zero-valent iron: A factorial design analysis. **Process Safety and Environment Protection**, v. 1, n. 3, 2017.

ALMEIDA, R. B.; SILVA, F. G. S.; FREIRE, M. B. G. S.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e produção de ácido acético por bactéria endofítica e diazotrófica isolada de *Brachiaria humidicola*. **XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão** – JEPEX. UFRPE, 2013.

ALMEIDA, F. A. M. **Contribuição para o estudo da remoção de Selênio em águas residuais**. Dissertação. Universidade Nova de Lisboa – Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente, setembro/2014.

AVENDAÑO R, CHAVES N, FUENTES P, SÁNCHEZ E, JIMÉNEZ JI, CHAVARRÍA M. Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440. **Scientific Reports**. 2016.

AWUAL, R.; HASAN, M.; IHARA, T.; YAITA, T. Mesoporous silica based novel conjugate adsorbent for efficient selenium(IV) detection and removal from water. **Microporous and Mesoporous Materials**, 2014.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Resolução n. 430**, de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.

BRASIL, Estado de Santa Catarina. **Lei Estadual n. 14675**, de 2009. Código Estadual do Meio Ambiente.

BUENO, B. M.; MOLINA, F. F.; TOREM, M L.; MESQUITA, L. M. S.; PINO, G. A. H. Remoção de Pb(II) de soluções aquosas por Biossorção em *R. opacus*. *Metalurgia & Materiais*, v. 62, n. 4, 2009.

CETESB. **Métodos de Avaliação de Poluentes a Organismos Aquáticos**. Cursos e Treinamentos. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo, v. 1, 2008.

DESSI, P.; JAIN, R.; SINGH, S.; SEDER-COLOMINA, M.; HULLEBUSCH, E. D.; RENE, E. R.; AHAMMAD, S. Z.; CARUCCI, A.; LENS, P. N. L. Effect of temperature on selenium removal from wastewater by UASB Reactors. **Water Research**, v. 94, 2016.

DORRAJI, M. S.; AMANI-GHADIM, Y. Performance of Chitosan based nanocomposite hollow fibers in the removal of selenium (IV) from water. **Chemical Engineering Research and Desing**, 2016.

ENVIRONMENT CANADA HEALTH. **Selenium and its compounds**. *Draft Screening Assessment Selenium*, 2015. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/evaluating-existing-substances/screening-assessment-selenium.html>>. Acesso em: mai/2018.

HAGEMAN, S. P. W.; WEIJDEN, R. D.; STAMS, A. J. M.; BUISMAN, C. J. N. Bio-production of selenium nanoparticles with diverse physical properties for recovery from water. **International Journal of Mineral Processing**, 2017.

HE, H.; CHEN, Y.; LI, X.; CHENG, Y.; YANG, C.; ZENG, G. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 1-8, 2016.

IKE, M.; TAKAHASHI, K.; FUJITA, T.; KASHIWA, M.; FUGITA, M. Selenate reduction by bactéria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. **Wat. Res.**, v. 34, n. 11, 2000.

KAGAMI, T.; NARITA, T.; KURODA, M.; NOTAGUCHI, E.; YAMASHITA, M.; SEI, K.; SODA, S.; IKE, M. Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. **Water Research**, v. 47, 2013

KÖNIG, S.; LUGUET, A.; LORAND, J.; WOMBACHER, F.; LISSNER, M. Selenium and tellurium systematics of the Earth's mantle from high precision analyses of ultra-depleted orogenic Peridotites. **Geochimica et Cosmochimica**, v. 86, 2012.

KOREN, D.; GOULD, W. E; LORTIE, L. Se removal from waste water. In: **Waste Processing and Recycling in Min. and Met. Industries**. CIM, Edmonton, Alberta, Can.1992

KUMAR, A., SEVONKAEV, I., GOIA, D.V. Synthesis of selenium particles with various morphologies. **J Colloid Interface Sci** 416, 119–123, 2014.

KURODA, M.; NOTAGUCHI E., SATO, A. YOSHIOKA M. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112 n. 3, 2011.

LIN, S.; MACKEY H. R.; HAO, T.; GUA, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; CHEN, G. Biological Sulfur Oxidation in Wastewater Treatment: A Review of Emerging Opportunities. **Water Research**, 2018.

LLOYD, J. R. Microbial reduction of metals and radionuclides. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, 2003.

LORTIE L., GOULD W. D., RAJAN S., MCCREADY R. G. L., CHENG K. J. Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* isolate. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 4042– 4044, 1992.

MACASKIE L. E.; MIKHEENKO I. P.; YONG P.; DEPLANCHE K.; MURRAY A.J.; PATERSON-BEEDLE M.; COKER V.S.; PEARCE C. I.; CUTTING R.; PATRICK R. A. D.; VAUGHAN D.; VAN DER LAAN G.; Lloyd J. R. Today's wastes, tomorrow's materials for environmental protection. **Hydrometallurgy**, 2010.

MEHDI, Y.; HORNICK, J.; ISTASSE, L.; DUFRASNE, I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. **Molecules**, v. 18, 2013.

MEYER, Daniel Derrossi. **Caracterização das comunidades bacterianas do ciclo do enxofre e seleção de isolados bacterianos potencialmente efetivos no controle de H₂S em estações de tratamento de efluentes**. Tese – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. – Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, RS, 2017.

NAKAMARU, Y.; TAGAMI, K.; UCHIDA, S. Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils. **Chemosphere**, v. 58, 2004.

NANCHARAI AH, V. N.; LENS, P. N. L. Selenium biomineralization for biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 6, 2015.

NANCHARAI AH, V. N.; LENS, P. N. L. Ecology and Biotechnology os Selenium-Respiring Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 1, 2015b.

MISHRA R. R.; PRAJAPATI S.; DAS J.; DANGAR T. K; DAS N.; THATOI H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product. **Chemosphere**, v. 84, 2011.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B .G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *burkholderia* spp. Endofíticas de canade-açúcar. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, Supplement 1,2012.

PONTON, D; HARE, L. Relating selenium concentrations in a planktivore to selenium speciation in lakewater. **Environmental Pollution**, v. 176, 2013.

PORTARIA n. 017/02. Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina – IMA. Estabelece os limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. Portaria nº 017 de 18 de abril de 2002.

RIZZO, A. C. L.; MILLIOLI, V.; LEMOS, J. L. S.; VALDMAN, E.; SANTOS, R. L. C. **Série Tecnologia Ambiental: Processos Biológicos de Remoção de Selênio de Efluentes**. CETEM/MCT: Rio de Janeiro, 2007.

RORABACHER, D.B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. **Analytical Chemistry**, v.63, n.2, p.139-146, 1991.

SANTOS S.; UNGUREANU G.; BOAVENTURA R.; BOTELHO C. Selenium contaminated waters: An overview of analytical methods, treatment options and recent advances in sorption methods. **Sci Total Environ**, 2015.

SEARS, M. Chelation: Harnessing and Enhancing Heavy Metal Detoxification - A Review. **The Scientific World Journal**, 2013.

SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. A. O selênio no meio ambiente. **Oecol. Bras.**, v. 11, n. 2, 2007.

SPITZNER, Elaine Cristine. **Estudo da toxicidade aguda de misturas de efluentes de uma indústria química inorgânica**. Dissertação – Universidade da região de Joinville, Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, Joinville/SC, 2013.

SZYMANSKA, S.; GRAZYNA, B. D.; JAROSLAW, T.; KATARZYNA, N.; AGNIESZKA, P.; KATARZYNA, H. Boosting the *Brassica napus* L. tolerance to salinity by the halotolerant strain *Pseudomonas stutzeri* ISE12. **Environmental and Experimental Botany**, 2019.

TAN L. C.; YARLAGADDA V. N.; HULLEBUSCH H. E.; LENS P, N. L. Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment Technologies. **Biotechnology Advances**, v. 34, 2016.

TSUBASA K., NARITA T., KURODA M.; NOTAGUCHI M.; YAMASHITA M.; IKE M. Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. **Water Research**, v. 47, 2013.

VON SPERLING M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. V. 1: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Departamento de Eng. San. e Ambiental - UFMG. Belo Horizonte, 240 p., 1995.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, 2006.

WINKEL, L.; JOHNSON, A.; LENZ, M.; GRUNDL, T.; LEUPIN, O.; AMINI, M.; CHARLET, L. Environmental Selenium Research: From Microscopic Processes to Global Understanding. **Environmental Science & Technology**, v. 46, 2012.

WINKEL, L. H. E.; VRIENS, B.; JONES, G. D.; SCHNEIDER, L. S.; PILON-SMITS, E.; BAÑUELOS, G. S. Selenium Cycling Across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review. **Nutrients**, v. 7, 2015.

YANG, S. I.; LAWRENCE, J. R.; SWERHONE, G. D. W.; PICKERING, I. J. Biotransformation of selenium and arsenic in multi-species biofilm. **Environ. Chem.**, v. 8, 2011.

APÊNDICE A

Figura 31 – Curva de calibração de concentração celular [X] em g/L de *P. stutzeri*.

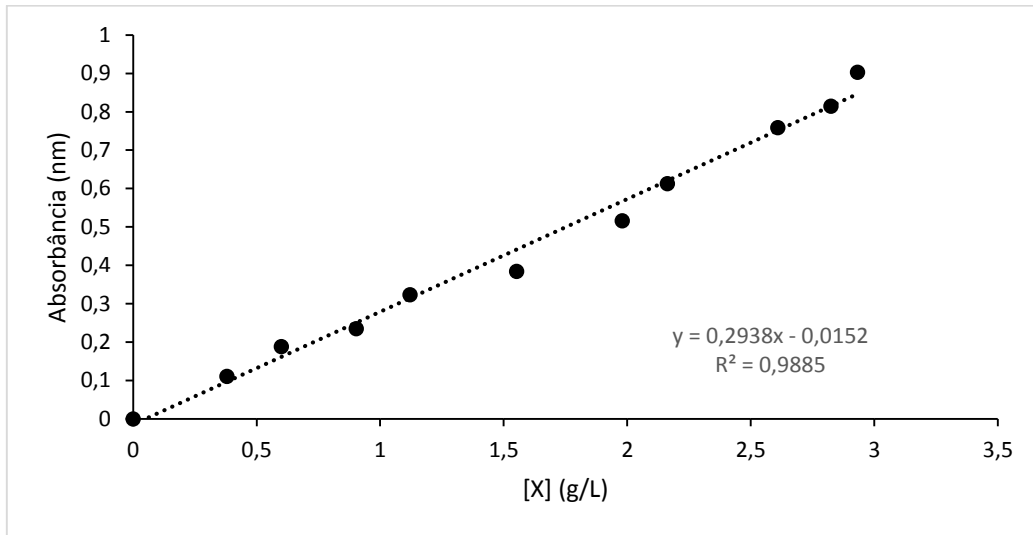
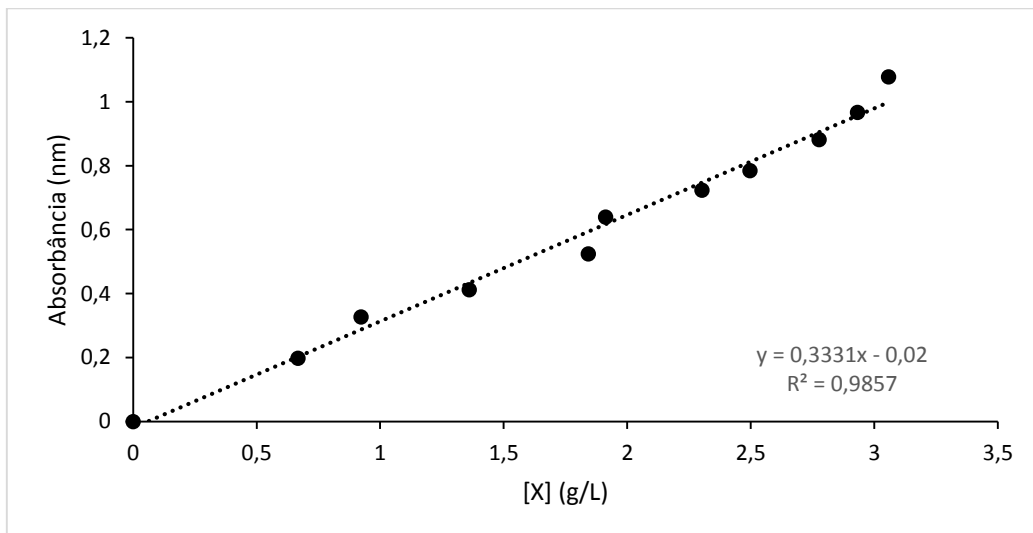


Figura 32 – Curva de calibração de concentração celular [X] em g/L de *P. putida*.



APÊNDICE B

Figura 33 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M1 e M3 de *P. stutzeri*.

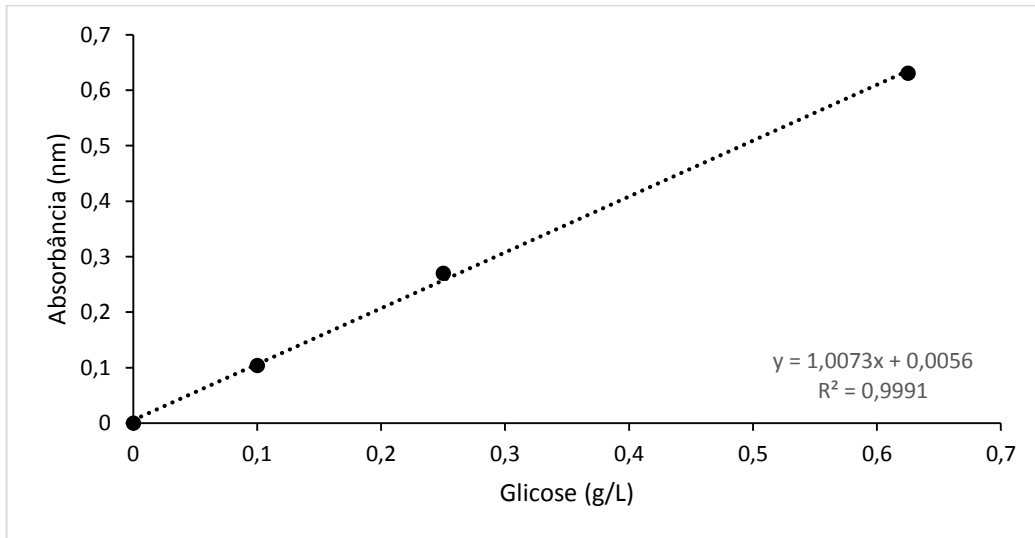


Figura 34 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M1 e M3 de *P. putida*.

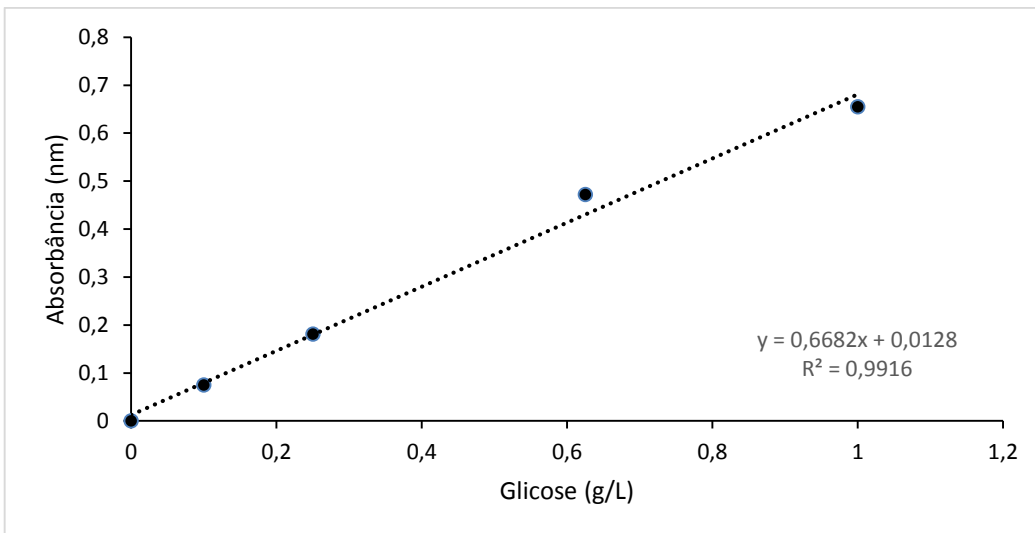


Figura 35 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M12 e M13 de *P. stutzeri*.

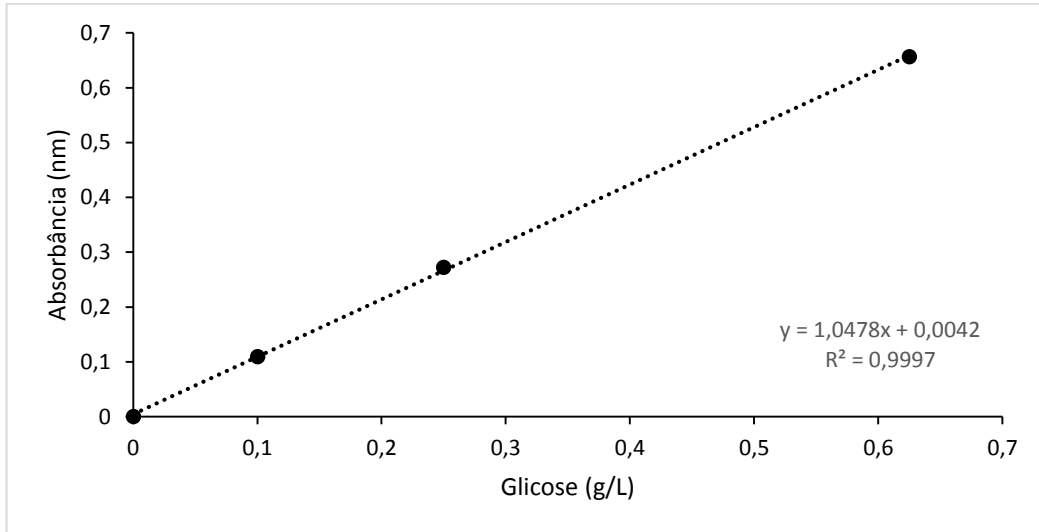
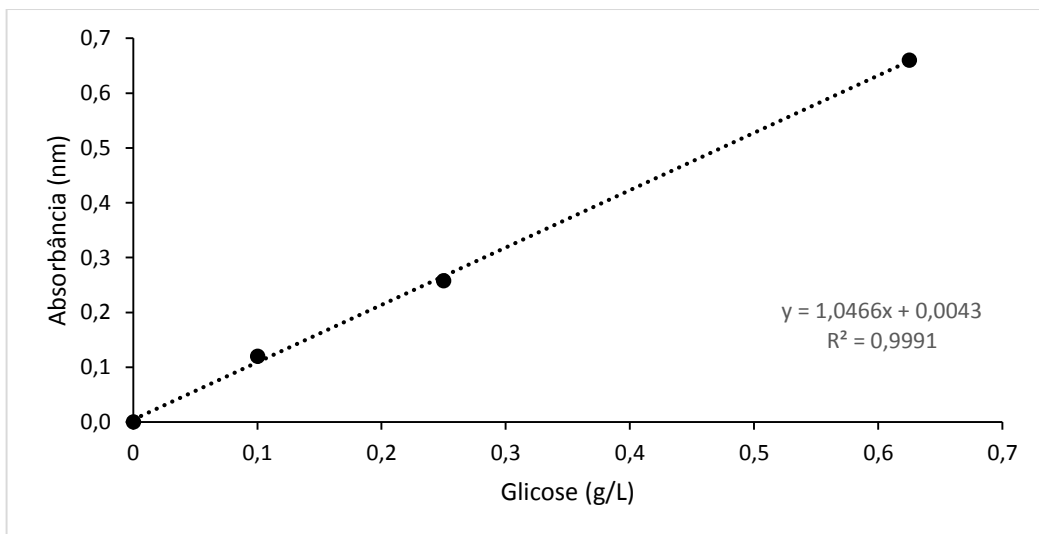


Figura 36 – Curva de calibração de concentração de glicose em g/L para os ensaios M12 e M13 de *P. putida*.



AUTORIZAÇÃO

Nome do(a) autor(a): Luana Priscila Just

RG: 5.589.942

Título da Dissertação: Biossorção de selênio por *Pseudomonas stutzeri* e *P. putida*

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 31 de Julho de 2019.

Luana Priscila Just
Assinatura do(a) aluno(a)