

Seleção de substratos padrões para ensaios respirométricos aeróbios com biomassa de sistemas de lodo ativado

Standards substrate selection for aerobic respirometric tests with biomass of activated sludge systems

Heraldo Antunes Silva Filho¹, Antônio Ricardo Mendes Barros²,
Elivânia Vasconcelos Moraes dos Santos³, José Tavares de Sousa⁴, Adrianus Cornelius van Haandel⁵

RESUMO

Nesta pesquisa investigou-se a influência de diferentes substratos na determinação da taxa específica de consumo de oxigênio de biomassa com cultura mista heterotrófica e autotrófica nitrificante, visando à caracterização do substrato mais adequado no desenvolvimento de ensaios respirométricos aeróbios. Foram utilizadas diferentes biomassas derivadas de quatro variantes de sistemas de lodo ativado. Os grupos heterotróficos e autotróficos nitrificantes foram avaliados em relação à sua velocidade de consumo dos substratos testados, sendo utilizada a técnica da respirometria aeróbia aberta semi-contínua de distintos pulsos, descrita em Van Haandel e Catunda (1982). Um respirometro automático acoplado a um computador foi utilizado em todos os testes respirométricos. Para identificar a taxa de consumo dos organismos heterotróficos, os substratos de fonte de carbono selecionados foram acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$), acetato de etila ($C_4H_8O_2$), etanol (C_2H_6O), glicose ($C_6H_{12}O_6$) e fenol (C_6H_6O). Para o grupo autotrófico nitrificante foram utilizados bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), cloreto de amônio (NH_4Cl) e nitrito de sódio ($NaNO_2$). Os resultados referentes ao grupo heterotrófico indicaram significativa diferença da taxa metabólica desses organismos na utilização dos substratos avaliados, exercendo maiores taxas de consumo de oxigênio para o acetato de sódio, enquanto para o grupo nitrificante o bicarbonato de amônio mostrou-se mais adequado. Comparando todos os sistemas estudados, observa-se a mesma tendência de maior biodegradabilidade ou afinidade aos substratos acetato de sódio e bicarbonato de amônio.

Palavras-chave: respirometria aeróbia; substratos; lodo ativado.

ABSTRACT

The influence of different substrates on the oxygen uptake rate (OUR) of sludge composed of heterotrophic and autotrophic bacteria was determined, in order to characterize the most suitable substrate for aerobic respirometric tests was the object of this research. Four different sludges were used, generated in variants of activated sludge systems. The OUR of the heterotrophic and autotrophic (nitrifying) bacteria was determined after additions of the different tested substrates by the technique of open semi-continuous aerobic respirometry, described in Van Haandel and Catunda (1982). An automated respirometer coupled to a computer was used in all respirometric tests. The OUR of the heterotrophic organisms, substrates was determined after adding separately sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$), ethyl acetate ($C_4H_8O_2$), ethanol (C_2H_6O), glucose ($C_6H_{12}O_6$) and phenol (C_6H_6O). For the autotrophic nitrifying group ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3), ammonium chloride (NH_4Cl) and sodium nitrite ($NaNO_2$) were used as substrates. The results of the tests with the heterotrophic group of bacteria showed that significant differences in the OUR and hence in the metabolic rate by these organisms when the selected substrates were used, with sodium acetate exerting the highest OUR. For the group of nitrifying bacteria ammonium bicarbonate was the most appropriate substrate. The tendency of highest biodegradability and substrate affinity for sodium acetate and ammonium bicarbonate was observed for all four sludges from the different systems that were used in the investigation.

Keywords: aerobic respirometry; substrates; activated sludge.

Trabalho realizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgoto Sanitário (EXTRABES) - Campina Grande (PB), Brasil.

¹Doutorando em Engenharia Ambiental na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) - Limoeiro do Norte (CE), Brasil.

²Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) - Campina Grande (PB), Brasil.

³Doutoranda em Engenharia Ambiental na UEPB. Professora do IFCE - Limoeiro do Norte (CE), Brasil.

⁴Doutor em Engenharia Civil pela Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP). Coordenador adjunto do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UEPB - Campina Grande (PB), Brasil.

⁵Doutor em Engenharia Civil pela University Of Cape Town. Professor da UFCG - Campina Grande (PB), Brasil.

Endereço para correspondência: Heraldo Antunes Silva Filho - Rua Estevão Remígio, 1145 - 62930-000 - Limoeiro do Norte (CE), Brasil - E-mail: heraldo@ifce.edu.br

Recebido: 15/05/14 - **Aceito:** 21/10/14 - **Reg. ABES:** 134471

INTRODUÇÃO

O estudo dos processos biológicos envolvidos na bioconversão dos poluentes presentes nas águas residuárias permite estimar a velocidade com que as reações se desenvolvem e, então, desenvolver projetos mais racionais e eficientes (SCURAS, 2001; MARSILI-LIBELLI, 2002). A respirometria é uma técnica capaz de auxiliar na caracterização dos parâmetros cinéticos de populações microbianas mistas ou puras através da medida do consumo de algum oxidante mediante pulso anterior de um substrato específico, que, por sua vez, será metabolizado. Em se tratando da respirometria aeróbia, o oxidante em questão é o próprio oxigênio (SPANJERS, 1995; 1999). Associada a avançados modelos matemáticos, que sumarizam o conhecimento acerca dos sistemas de lodo ativado, a respirometria torna-se útil para projetos e operações de estações de tratamento de águas residuárias. Portanto, consideráveis esforços estão sendo direcionados para desenvolver métodos que conduzam a determinação dessas características cinéticas (GUJER *et al.*; 1999).

Segundo Van Haandel e Marais (1999), a essência dos ensaios respirométricos se fundamenta na relação que existe entre a taxa de consumo de oxigênio (TCO) e a quantidade de substrato adicionado. Para os organismos heterotróficos, essa relação se dá na proporção de 1:1, ou seja, 1 unidade de matéria orgânica solúvel biodegradável que será oxidada vai requerer 1 unidade de oxigênio para essa oxidação. Contudo, ressaltasse que apenas 1/3 (33%) da matéria orgânica tende a ser direcionada para o metabolismo catabólico, sendo o restante (2/3; 67%) conduzido para o anabolismo.

Para os organismos autotróficos nitrificantes, essa relação é diferente, sabendo que para a oxidação de 1 mg.L⁻¹ de nitrogênio na forma de amônia são requeridos 4,57 mg.L⁻¹ de oxigênio caso seja conduzida a nitrificação convencional (nitritação seguida de nitratação). Diferente do grupo heterotrófico, os organismos autotróficos nitrificantes possuem uma taxa anabólica muito pequena, assumindo dessa forma que quase a totalidade do nitrogênio presente no meio será direcionada para o catabolismo. Assim, estabelecida a relação da TCO com a quantidade de substrato adicionado, somado ao conhecimento prévio da estequiometria de rendimento celular desses organismos, é possível aplicar a respirometria como instrumental para avaliação do metabolismo heterotrófico e autotrófico.

Em síntese, uma avaliação respirométrica aeróbia pode ser descrita conforme o modelo cinético de Monod (1949), onde a taxa máxima de crescimento de um organismo é função direta da concentração dos substratos necessários para o seu metabolismo e função inversa da concentração da constante de meia saturação de Monod. Por sua vez, a constante de meia saturação de Monod expressa o valor necessário do substrato para limitar ou reduzir em 50% a taxa máxima de crescimento.

Sobre os procedimentos para determinação dos dados cinéticos e estequiométricos de comunidades biológicas em sistemas de lodo ativado, é comum o uso de substratos específicos que serão consumidos por grupos alvo, a exemplo de fonte de carbono para os grupos

heterotróficos e fonte de nitrogênio para os grupos nitrificantes. Contudo, apesar da importância da respirometria, observam-se poucos estudos delimitando os contornos de execução do teste, especialmente acerca de quais substratos devem ser utilizados. Dentre as várias possíveis fontes de carbono, a glicose é comumente utilizada, especialmente, pela sua fácil obtenção e simples estrutura, estudada em diversas áreas do conhecimento (engenharia de alimentos, bioquímica, biologia, dentre outras). Na Tabela 1, apresentam-se alguns trabalhos que caracterizaram cineticamente diferentes microrganismos utilizando a glicose e outros constituintes como substrato modelo.

Apesar da frequente utilização da glicose, bem como de outros substratos como o etanol, metanol, fenol, dentre outros, desconhece-se qual ou quais desses substratos podem ser interpretados como o substrato padrão de maior biodisponibilidade para os organismos estudados. Entende-se que o substrato padrão será aquele no qual o organismo terá

Tabela 1 – Substratos utilizados para caracterização cinética ou fonte primária de carbono para alguns microrganismos em diferentes pesquisas.

| Microrganismos | Fonte de Carbono | Referência |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Bacillus acidocaldarius</i> NRRC-207 F | Frutose | Kocabas <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>subespécie kurstaki</i> HD-1 | Glicose | Rowe <i>et al.</i> (2003) |
| Biomassa fúngica | Glicose | Rodrigues <i>et al.</i> (2010) |
| Biomassa fúngica | Glicose | Rodrigues <i>et al.</i> (2007) |
| Biomassa fúngica | Glicose | Andrade <i>et al.</i> (2013) |
| Biomassa de fórmula molecular CHI.7900.5N0.20 | Glicose | Heijnen; Roels (1981) |
| <i>Candida bombicola</i> NRRL Y-17069 | Glicose | Casas (1996) |
| <i>Escherichia</i> <i>coli</i> K 12 ^a | Glicose | Calik <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Escherichia</i> <i>coli</i> K 12 ^c | Glicose | Calik <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Hansenula anomala</i> CBS6759 | Glicose | Djelal <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Phaffia rhodozyma</i> ENMS 1100 | Glicose | Liu <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> IGTS8 | Glicose, ácido glutâmico e citrato | Gomes <i>et al.</i> (2006a) |
| <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> CECT 5279 | Glicose, ácido glutâmico e citrato | Gomes <i>et al.</i> (2006b) |
| <i>Trigonopsis variabilis</i> CBS 4095 | Glicose | Montes <i>et al.</i> (1997) |
| <i>Xanthomonas campestris</i> NRRL 1775 | Sacarose | Garcia-Ochoa <i>et al.</i> (2000) |

a maior afinidade (maior taxa de consumo), menor valor da constante de meia saturação (MONOD; 1949), e fará com que se desenvolva a taxa máxima de consumo de oxigênio (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010). O mesmo é válido para substratos que subsidiem fonte de nitrogênio. Contudo, a dificuldade na escolha é menor do que as fontes de carbono, pois, diferente desta, a fonte de nitrogênio em sistemas biológicos de tratamento é advinda geralmente nas formas amoniacais, sendo, portanto, facilmente suprida por sais de amônia e nitrito solúveis.

A escolha do substrato adequado para os testes respirométricos é decisiva sobre o resultado final dos ensaios e na conclusão que será obtida sobre as propriedades biológicas das comunidades estudadas. Caso seja utilizada uma fonte de carbono ou de nitrogênio na qual o organismo desenvolva pouca afinidade, é comum a mensuração de uma baixa taxa de consumo de oxigênio e, conseqüentemente, se subestimar a capacidade de tratamento por parte desse lodo (SOUZA, 2005; RODRIGUES, 2005).

Outro aspecto importante é que, caso o substrato não esteja comumente disponível nas águas residuárias na qual o organismo teve origem, o lodo não estará adaptado ou aclimatado e desempenhará baixa afinidade. Um exemplo típico para essa situação é o que ocorre com o fenol e o acetato de etila, ambos tóxicos, mas que, quando presentes na água residuária em que o lodo foi gerado, apresentam essa toxicidade minimizada (provavelmente por seleção de organismos autóctones e resistentes aos compostos) (AGARRY, 2009).

Dessa forma, considerando a necessidade de se estabelecer as melhores condições para testes respirométricos, especificamente sobre quais substratos podem representar condições ideais de afinidade e taxa máxima de consumo, esse trabalho traz como proposta o estudo de diferentes substratos como fonte de carbono e de nitrogênio para caracterização de propriedades biológicas em testes respirométricos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram construídas e operadas quatro variantes do sistema de lodo ativado, três em regime intermitente e uma em fluxo contínuo, todos

operados com idade de lodo suficiente para a promoção da nitrificação (maior que 10 dias) sob condições de temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Como substratos foram selecionados cinco representantes para fonte de carbono e três para fonte de nitrogênio.

Substratos utilizados

Na Tabela 2 apresentam-se os substratos que foram selecionados para avaliação da taxa específica de utilização de oxigênio. Todos os reagentes foram adquiridos com padrão analítico e preparadas soluções estoque de modo que, em cada pulso dosado nos testes respirométricos, fosse previamente conhecida a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e o nitrogênio na forma de Amônia (N-NH_4^+) ou Nitrito (N-NO_2^-) que seriam disponibilizados. Para tanto, análises de DQO foram realizadas para os substratos 1, 2, 3, 4, 5 e 6; análises de amônia para os substratos 7 e 8 e, por fim, análise de nitrito para o substrato 9. Na Tabela 3 encontram-se os métodos utilizados para essas análises. As poucas formas de nitrogênio escolhidas são decorrentes da seletividade dos organismos autotróficos a um único monosubstrato, seja de amônia ou de nitrito, diferente do que ocorre para os organismos heterotróficos.

Tabela 3 - Análises realizadas para quantificação dos substratos utilizados.

| Parâmetros | Métodos Analíticos |
|--|---|
| DQO (mg. L ⁻¹) | Digestão em Refluxação Fechada - Método Titulométrico <i>Standard Methods 5220 C. / APHA et al. (2012)</i> |
| Amônia N-NH_4^+ (mg. L ⁻¹) | Destilação - Método Titulométrico <i>Standard Methods 4500-NH₃ / APHA et al. (2012)</i> |
| Nitrito N-NO_2^- (mg. L ⁻¹) | Diazotização - Método Colorimétrico <i>Standard Methods 4500-NO₂ B / APHA et al. (2012)</i> |

DQO: Demanda Química de Oxigênio.

Tabela 2 - Substratos utilizados como fonte de carbono e fonte de nitrogênio nos ensaios respirométricos.

| Nº | Substratos | Função Química | Fórmula Molecular | Grupo Alvo |
|----|-------------------------|--|-------------------------------------|---|
| 1 | Acetato de Etila | Éster Simples | $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ | Organismos heterotróficos |
| 2 | Acetato de Sódio | Sal Trihidratado | $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ | |
| 3 | Etanol (Álcool Etilico) | Álcool | $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ | |
| 4 | Fenol | Fenol | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ | |
| 5 | Glicose | Monossacarídeo | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | |
| 6 | Bicarbonato de Amônio | Carbonato Ácido de Hidrogênio e Amônia | NH_4HCO_3 | Organismos autotróficos nitrificantes (nitritadores e nitratadores) |
| 7 | Cloreto de Amônio | Sal Amoníaco | NH_4Cl | |
| 8 | Nitrito de Sódio | Sal | NaNO_2 | |

Sistemas de Lodo Ativado

Os sistemas utilizados para geração dos lodos que seriam conduzidos aos testes respirométricos foram construídos e operados simultaneamente, tendo como afluente esgoto sanitário. No Quadro 1 apresenta-se uma breve descrição sobre os sistemas operados e na Tabela 4 mostram-se as dimensões e principais características de cada sistema.

Testes respirométricos

Os ensaios respirométricos seguiram o protocolo descrito primeiramente por Van Haandel e Catunda (1982) e Catunda *et al.* (1996), posteriormente aprimorado por diversos pesquisadores (DERKS, 2007; SILVA FILHO, 2009; MIRANDA, 2012; SANTOS, 2013), tendo a mesma essência matemática de 1982.

Quadro 1 - Sistemas operados para obtenção do lodo utilizado nos testes respirométricos.

| Sistemas | | Característica Conceitual |
|----------|---|--|
| S1 | University of Cape Town com quatro reatores (UCT) | Sistema em fluxo contínuo especialista na remoção de fósforo e com duas zonas dedicadas para desnitrificação (pré e pós-D). Composto de quatro reatores sendo o primeiro um reator anaeróbio, o segundo um reator anóxico, o terceiro aeróbio e o quarto reator anóxico. |
| S2 | Reator em Batelada Sequencial de câmara única (coluna de bolhas) | Um reator clássico em fluxo intermitente, contendo apenas uma câmara de reação. Nesse reator foram estabelecidos ciclos de 5 fases: 1 - Alimentação, 2 - Hidrólise, 3 - Aeração, 4 - Sedimentação, 5 - Descarte do esgoto tratado. |
| S3 | Reator em Batelada Sequencial de duas câmaras (zonas dedicadas ou air lift) | Sistema composto de duas câmaras de reação comunicantes, sendo uma destinada para ambiente aeróbio (promovendo nitrificação) e a outra para ambiente anóxico (recebendo nitrato da primeira). |
| S4 | Reator em Batelada Sequencial de câmara única (aeração prolongada) | Similar ao reator 2, contudo, aplicou-se maior idade de lodo (30 dias) e menor vazão afluente. |

Tabela 4 - Características operacionais dos sistemas de lodo ativado.

| Características | Sistema 1 | Sistema 2 | Sistema 3 | Sistema 4 |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Volume total (L) | 280 | 20 | 20 | 100 |
| Volume útil (L) | 234 | 15 | 15 | 90 |
| Idade de lodo (d ¹) | 20 | 20 | 20 | 30 |
| Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹) | -3 | -3 | -3 | -1 |
| Número de ciclos por dia | - | 5 | 5 | 1 |
| Vazão afluente (L.d ¹) | 300 | 24 | 24 | 70 |
| Duração do Ciclo (h) | - | 4,8 | 4,8 | 24 |

Para cada sistema, foram tomadas alíquotas de um litro do licor misto e realizados os testes respirométricos e a análise de sólidos suspensos totais e voláteis (método gravimétrico, *Standard Methods* 2540 D / APHA *et al.* 2012). Após, garantido o estabelecimento da taxa de consumo de oxigênio (TCO) endógena, ou seja, ausência de substrato extracelular, adicionavam-se pulsos unitários dos substratos. Cada batelada de teste foi desenvolvida em banho termocontrolado, garantindo temperatura média entre 28 a 30°C. Um agitador mecânico mantinha o lodo em suspensão nos momentos sem aeração.

O respirômetro utilizado foi do tipo aberto e semi-contínuo acoplado a um sensor de oxigênio dissolvido (OD) e de temperatura, programado para capturar dados de OD a cada 5 segundos e de temperatura a cada ½ minuto. Os dados obtidos eram então armazenados em planilhas eletrônicas para posterior tratamento. Na Figura 1, encontra-se a ilustração do aparato instrumental utilizado (parte superior) e um exemplo de um respirograma (parte inferior).

Para possibilitar a comparação entre os efeitos de cada substrato, foram determinadas para cada lodo as constantes de utilização específica dos substratos e suas constantes máximas de crescimento específico, conforme descrito e fundamentado em Van Haandel e Van Der Lubbe (2012). Na Tabela 5 apresentam-se as equações utilizadas com suas respectivas unidades para a determinação das constantes para os organismos heterotróficos e autotróficos nitrificantes (Equações 1 a 8).

Os valores das taxas de consumo de oxigênio exógena (TCO exo) e endógena (TCO end) foram obtidos de cada teste a partir dos respirogramas correspondentes. Para cada substrato, foram realizados 2 testes, gerando um total de 64 perfis (8 substratos x 4 sistemas x 2 testes para cada substrato = 64 perfis respirométricos).

RESULTADOS

Após o estabelecimento das condições adequadas da biomassa em cada sistema, deu-se início aos ensaios respirométricos. Na Tabela 6 apresenta-se a média percentual de remoção de DQO e de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) ao longo de 90 dias de operação e a concentração média de sólidos obtida nos sistemas.

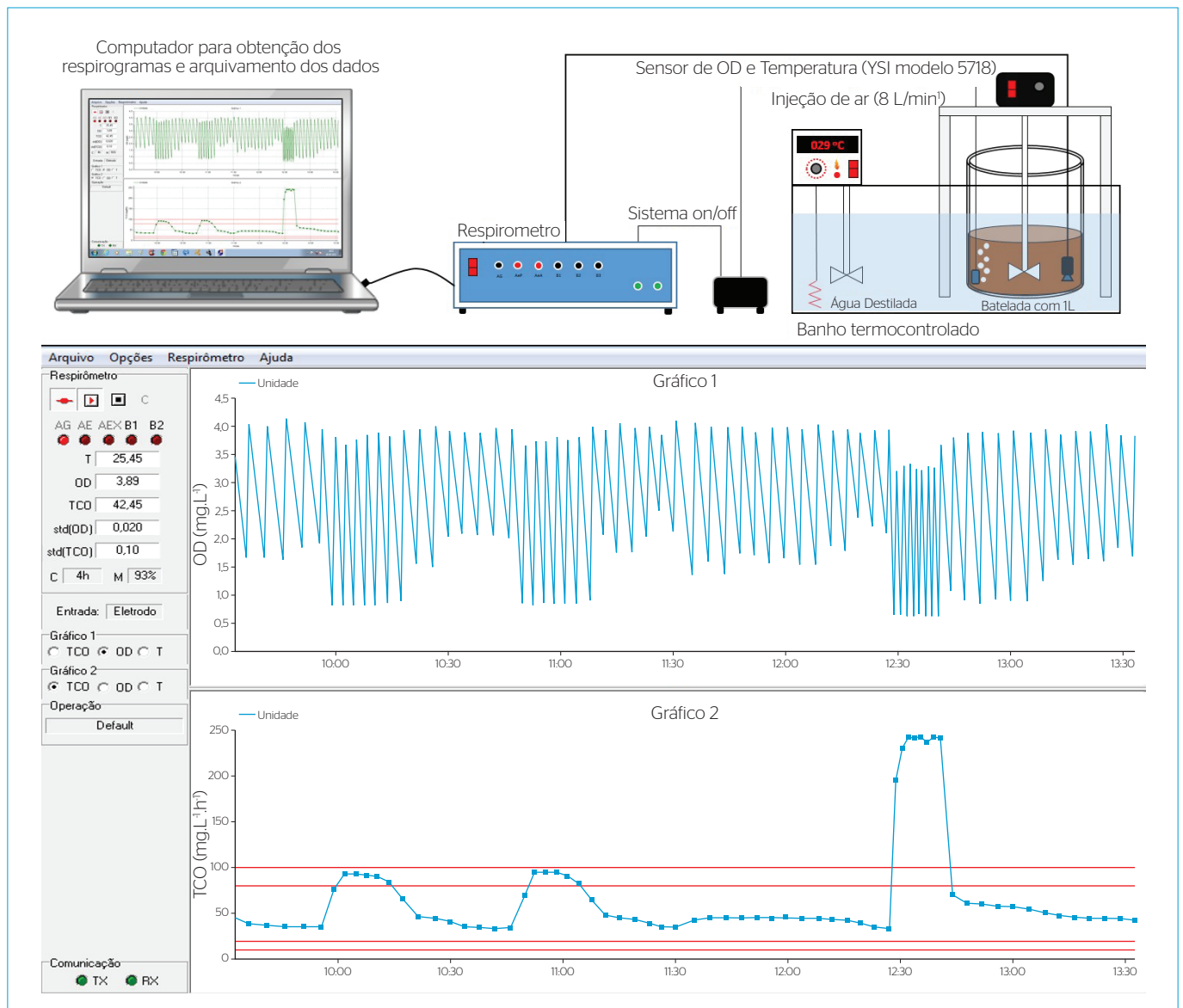


Figura 1 - Ilustração da instrumentação utilizada em cada teste respirométrico (parte superior) e respirograma típico obtido em um ensaio respirométrico (parte inferior).

Para os organismos heterotróficos

Mediante os testes respirométricos desenvolvidos, foi possível obter diversos respirogramas semelhantes ao exposto na Figura 2.

Um aspecto recorrente nos testes com substratos para organismos heterotróficos foi a baixa recuperação da matéria orgânica adicionada. Essa recuperação foi determinada através do cálculo da área dos gráficos sabendo que 33% da DQO adicionada vai para o catabolismo, segundo Gujer *et al.* (1999) e Van Haandel e Marais, (1999). Exceto os substratos acetato de sódio e etanol, que exerceram recuperação média de 99% do que foi adicionado, os demais substratos não ultrapassaram o limite médio de 50% de recuperação, o que denota possível dificuldade na assimilação do mesmo. Na Tabela 7 apresentam-se as médias de recuperações encontradas em todos os testes.

Outra justificativa para a baixa oxidação dos substratos Fenol e Acetato de Etila é o seu potencial tóxico, o que pode ter inibido ou inativado os organismos presentes no teste (LOVANH & ALVAREZ, 2004; BEN-YOUSSEF & VÁZQUEZ-RODRIGUEZ, 2011). Esse fato pôde ser observado a partir de novas adições de substratos com alta afinidade, como o acetato de sódio, que resultaram em uma redução de até 30% da sua taxa máxima de utilização de substrato quando adicionados após a adição de Fenol ou Acetato de Etila. A Glicose apresentou o menor percentual médio de recuperação (27,41%), evidenciando que apenas uma pequena parcela da DQO adicionada foi oxidada. Com os testes realizados, não é possível inferir se a parcela que não foi oxidada (além dos 66% já esperados) também seguiu a rota do anabolismo ou ficou inalterado no sistema.

Gebremaria *et al.* (2012) estudaram o efeito da glicose na performance da remoção de fósforo em diferentes sistemas de lodo ativado em batelada enriquecidos com acetato. Segundo os autores, a glicose aumentou significativamente a atividade biológica do lodo (K_{ms}) quando na proporção de 50/50% entre glicose e acetato e observou-se uma redução drástica nessa mesma atividade quando a proporção foi de 75/25% de glicose e acetato, respectivamente, sendo praticamente nula quando da substituição do reator controle contendo 100% de

acetato para 100% de glicose. Esse fato é corroborado com o estudo de Hanaki *et al.* (1990) que apresenta a glicose como um metabolito secundário, não sendo utilizado como principal fonte de carbono.

Na Figura 3 apresentam-se as taxas específicas de consumo de DQO (K_{ms}) obtidas para cada sistema mediante a adição dos diferentes substratos. É possível observar que em todos os sistemas o destaque foi para o acetato de sódio. O etanol, mesmo possuindo recuperação média de 100% da DQO adicionada, apresentou baixas taxas de consumo e de crescimento.

Tabela 5 - Equações utilizadas para a determinação das constantes cinéticas heterotróficas.

| Símbolo | Equações para os organismos heterotróficos e autotróficos | |
|----------------|--|-----------|
| K_{ms} | $\frac{3 \cdot TCO_{exo\ máx} \cdot 24}{X_a}$ | Equação 1 |
| $\mu_{m\ het}$ | $Y_h \cdot K_{ms}$ | Equação 2 |
| X_a | $\frac{TCO_{end\ máx} \cdot 24}{(f_{cv} \cdot (1 - \beta) \cdot b_h)}$ | Equação 3 |
| b_h | $0,24 \cdot 1,04^{(T-20)}$ | Equação 4 |
| r_n | $\frac{TCO_{exo\ máx}}{4,57} \cdot 24$ | Equação 5 |
| $\mu_{m\ n}$ | $\frac{Y_n \cdot r_n}{X_n}$ | Equação 6 |
| X_n | $\frac{Y_n \cdot R_s \cdot Nc}{((1 + b_n \cdot R_s) \cdot Rh)}$ | Equação 7 |
| b_n | $0,04 \cdot 1,03^{(T-20)}$ | Equação 8 |

K_{ms} : constante específica de utilização do substrato (mgDQO.mgXa⁻¹.d⁻¹);
 $\mu_{m\ het}$: constante de crescimento específico máximo para grupo heterotrófico (d⁻¹);
 X_a : concentração de organismos ativos heterotróficos na biomassa volátil (mg SSV. l⁻¹);
 b_h : constante de decaimento dos organismos heterotróficos (d⁻¹);
 Y_h : coeficiente de rendimento celular para bactérias heterotróficas, adotado 0,45 (GUJER *et al.* 1999);
 T: temperatura do líquido, controlada nos ensaios para 29°C;
 f : fração de residuo endógeno, adotado 0,2 (VAN HAANDEL & MARAIS, 1999)
 f_{cv} : proporção de matéria orgânica por massa de lodo (mgDQO.mgSSV⁻¹), adotado 1,5 (VAN HAANDEL & MARAIS, 1999).
 r_n : constante específica de utilização do substrato (mgN.mgXn⁻¹.d⁻¹);
 $\mu_{m\ n}$: constante de crescimento específico máximo para grupo autotrófico nitrificante (d⁻¹);
 X_n : concentração de organismos ativos nitrificantes na biomassa volátil (mg SSV. l⁻¹);
 b_n : constante de decaimento dos organismos autotróficos nitrificantes (d⁻¹);
 Y_n : coeficiente de rendimento celular para bactérias autotróficas nitrificantes, adotado 0,1 (GUJER *et al.* 1999);
 T: temperatura do líquido, controlada nos ensaios para 29°C;
 N_c : capacidade de nitrificação (VAN HAANDEL & MARAIS, 1999)
 R_h : tempo de detenção hidráulica (d⁻¹)

Para os organismos autotróficos nitrificantes

Diferente dos resultados para os substratos como fonte de carbono, para os grupos autotróficos nitrificantes foi observada uma recuperação média superior a 88% para todos os substratos. A Figura 4 retrata um perfil típico obtido para o grupo autotrófico nitrificante mediante adição de bicarbonato de amônio e cloreto de amônio quando era estabelecida a TCO endógena. Na Figura 5 é apresentado os valores de r_n .

É possível perceber que independente do sistema, o comportamento foi similar para os dois substratos (exceto para o reator em bateladas sequenciais (RBS) com aeração prolongada, onde a diferença superou 40%). Contudo, o bicarbonato de amônio apresentou-se marginalmente superior ao cloreto de amônio. Conforme Silva Filho (2009), esse fato é positivamente agregado ao valor que o bicarbonato de amônio possa ter na reposição da alcalinidade do sistema, visto que, durante o metabolismo nitrificante existe redução do pH e em testes muito longos (com adição elevada de amônia), essa variação de pH pode ser brusca o suficiente para inviabilizar o experimento.

Assim, apesar de não haver significativa diferença entre os valores de r_n na maioria dos sistemas, é aceitável assumir que o bicarbonato de amônio seja mais recomendado em ensaios respirométricos.

Esse mesmo perfil é confirmado nos valores obtidos das taxas específicas de crescimento para as nitrificantes, apresentadas na Figura 6, onde o destaque é também para o bicarbonato de amônio (maiores valores de μ_{mn}).

Acerca do nitrito de sódio, este se mostrou constante em todos os testes e com recuperação superior a 98%. Esse resultado é corroborado com diversos trabalhos que mostraram a boa associação do nitrito de sódio como substrato modelo (DERKS, 2007; SANTOS, 2013; SILVA FILHO; 2009). Além disso, a dissociação no nitrito é extremamente rápida, o que o torna disponível sem muitos problemas.

Tabela 6 - Percentuais médios (n=11) de remoção de Demanda Química de Oxigênio e Nitrogênio Total Kjeldahl no tanque de aeração e concentração de sólidos.

| Variável | Sistema 1 | Sistema 2 | Sistema 3 | Sistema 4 |
|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| DQO | 92,6% | 90,9% | 88,7% | 84,8% |
| NTK | 96,6% | 90,6% | 90,1% | 95,0% |
| SST | 3,7 g.L ⁻¹ | 4,3 g.L ⁻¹ | 3,4 g.L ⁻¹ | 4,5 g.L ⁻¹ |
| SSV | 2,5 g.L ⁻¹ | 3,2 g.L ⁻¹ | 2,2 g.L ⁻¹ | 2,1 g.L ⁻¹ |

DQO: Demanda Química de Oxigênio; NTK: Nitrogênio Total Kjeldahl; SST: Sólidos Suspensos Totais; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis; n: número de determinações.

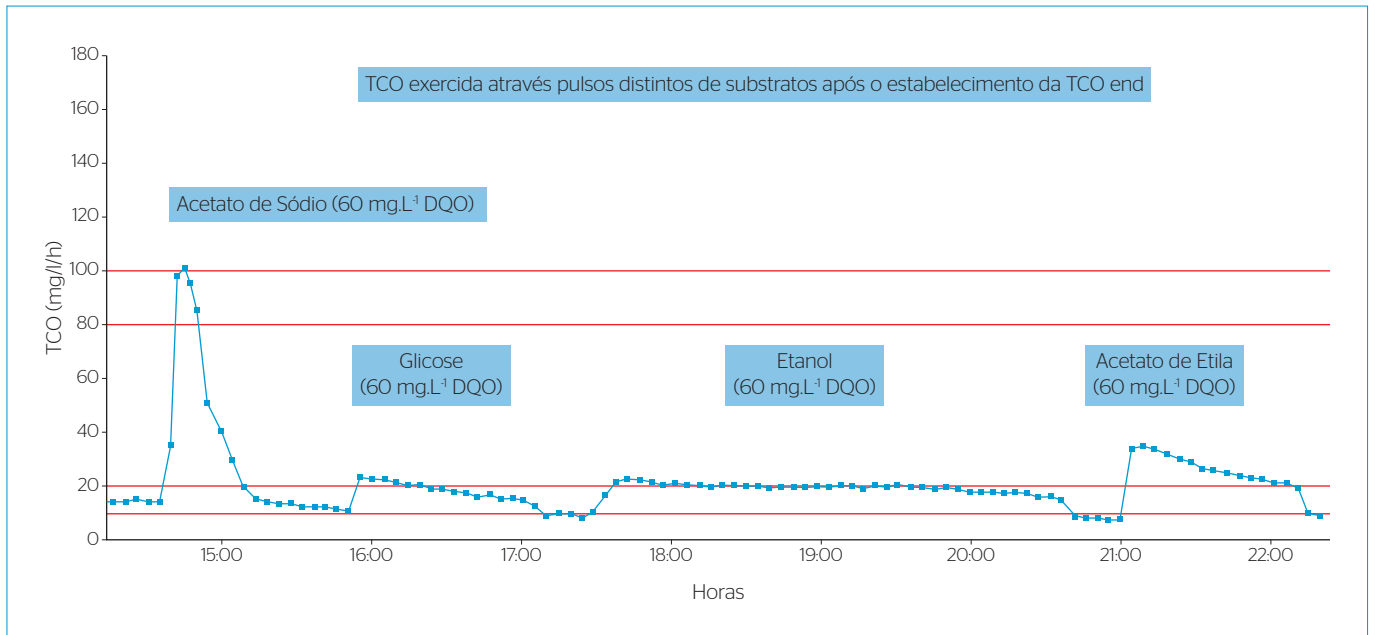


Figura 2 - Perfil típico de taxa de consumo de oxigênio obtido em um teste com pulsos seguidos de substratos com vários substratos para o sistema 1 (University of Cape Town).

Tabela 7 - Avaliação dos percentuais de recuperação da Demanda Química de Oxigênio adicionada em cada teste.

| | UCT | Câmara Única | Aeração Prolongada | Duas Câmaras | Média |
|------------------|-----|--------------|--------------------|--------------|-------|
| Acetato de Sódio | 99% | 95% | 100% | 100% | 98% |
| Acetato de Etila | 63% | 71% | 30% | 55% | 54% |
| Etanol | 98% | 105% | 103% | 97% | 100% |
| Fenol | 14% | 69% | 20% | 75% | 44% |
| Glicose | 32% | 26% | 5% | 46% | 27% |

UCT: University of Cape Town.

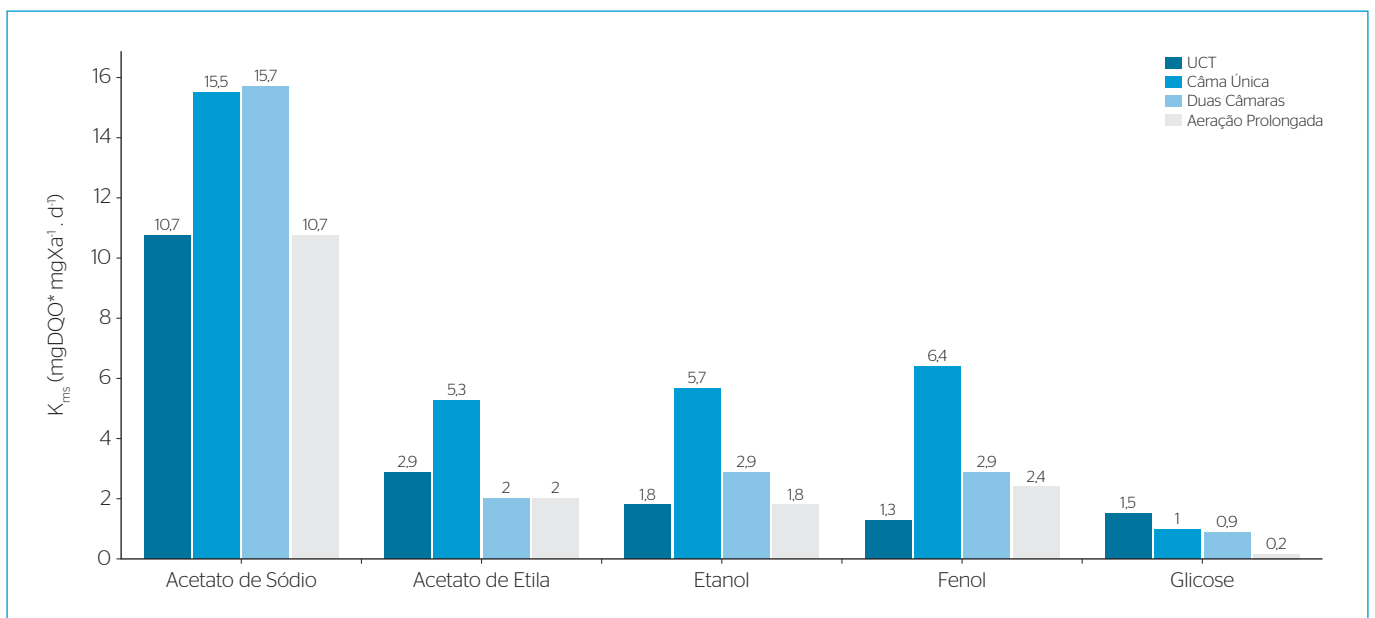


Figura 3 - Constante específica de utilização do substrato observada com os diferentes substratos para organismo heterotróficos (referência em 29°C).

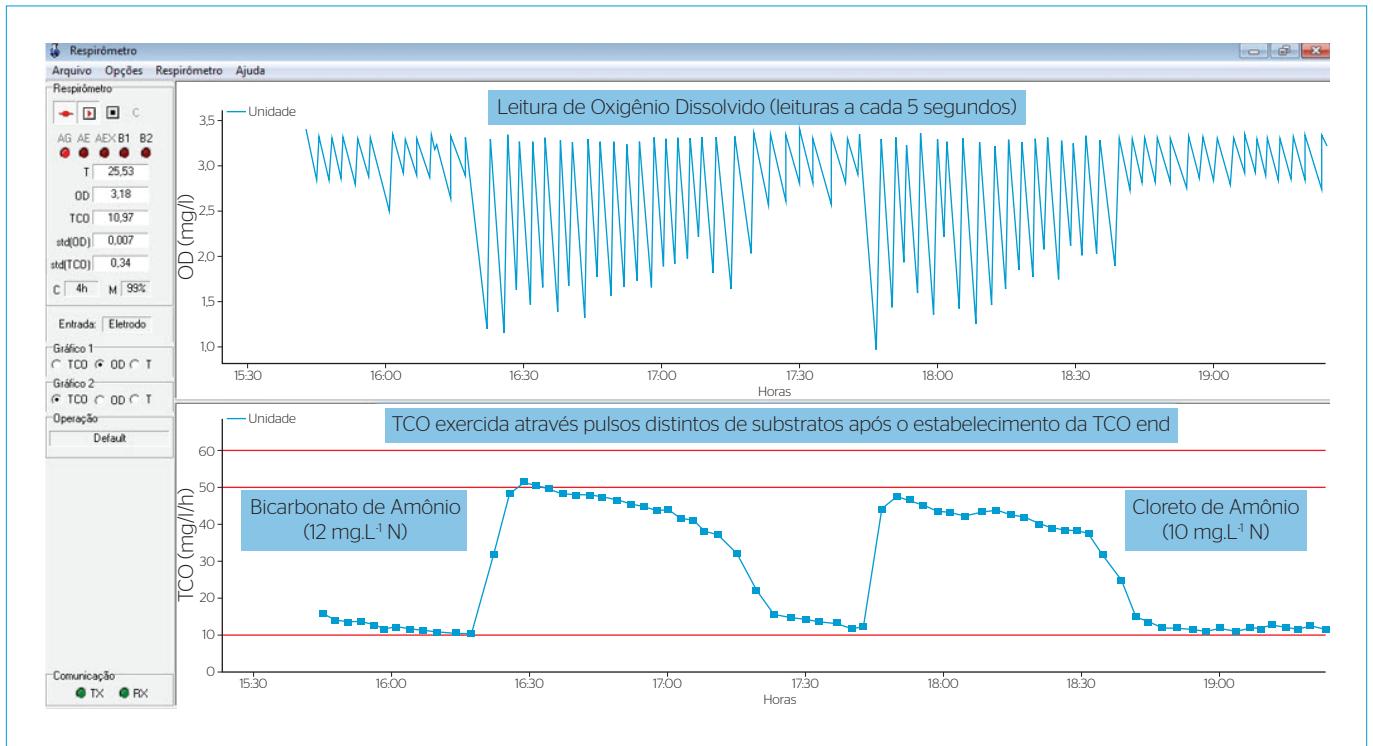


Figura 4 - Perfil típico de taxa de consumo de oxigênio e Oxigênio obtido em um teste com pulsos seguidos de substratos com fonte de Nitrogênio para o sistema 2 (reator em bateladas sequenciais - RBS Câmara Única).

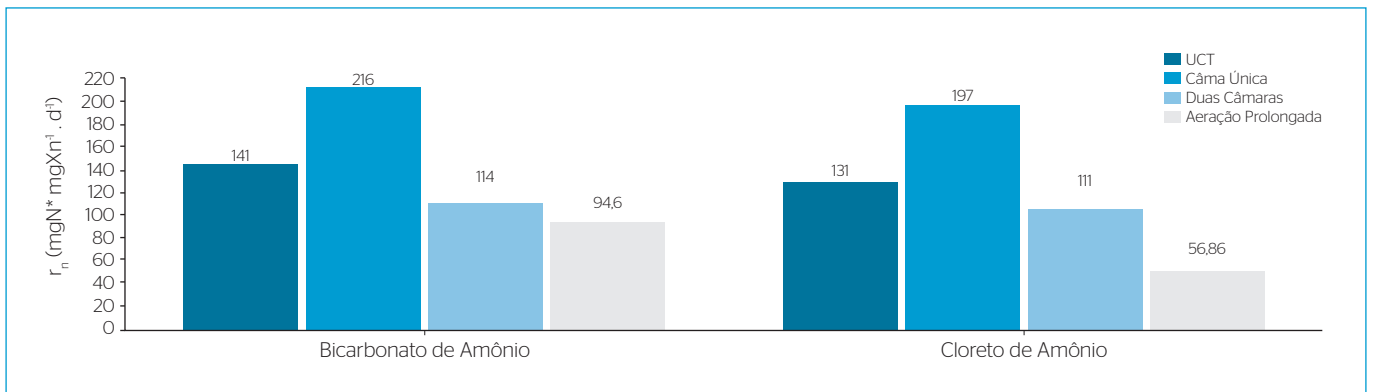


Figura 5 - Constante específica de utilização do substrato observada para organismos autotróficos (referência em 29°C).

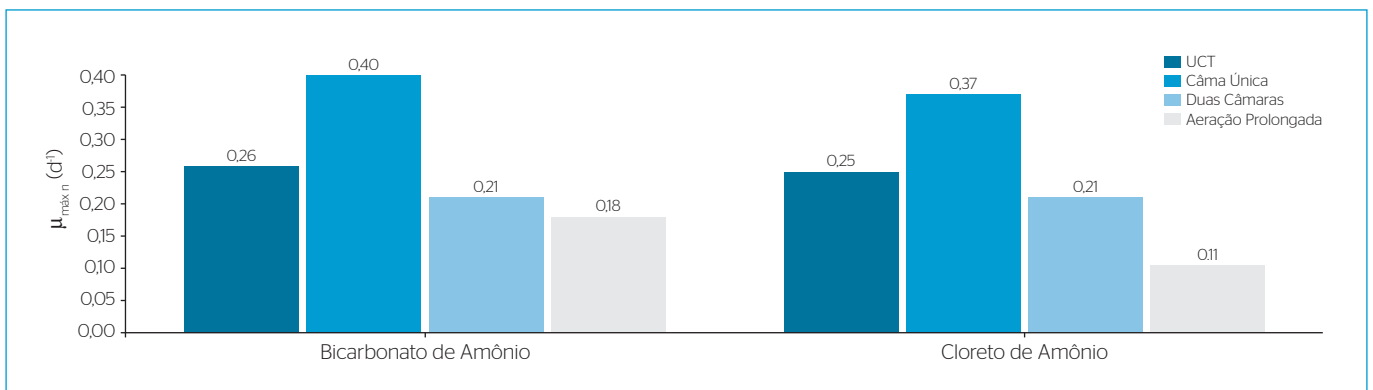


Figura 6 - Constante específica de crescimento máximo para organismos autotróficos (referência em 29°C).

CONCLUSÃO

Os ensaios realizados nas condições expostas permitiram concluir que:

- o melhor substrato para a caracterização das propriedades biológicas de organismos heterotróficos em condição de máxima utilização foi o Acetato de Sódio;
- não houve significativa diferença entre o Bicarbonato de Amônio e o Cloreto de Amônio na caracterização das propriedades biológicas de organismos autotróficos nitrificantes; contudo, torna-se mais vantajoso o uso do Bicarbonato de Amônio devido a reposição de alcalinidade no meio, evitando variações bruscas no pH;
- o Nitrito de Sódio obteve boa recuperação em todos os testes efetuados, mostrando viabilidade de sua utilização como substrato modelo à caracterização dos organismos nitrificadores; contudo, é necessário sua comparação com outros substratos para atestar com clareza sua indicação;
- os resultados gerais levam a conclusão de que a plena biodisponibilidade de DQO na forma biodegradável e solúvel não necessariamente signifique que haja 100% de afinidade. Mesmo com o destaque do Acetato de Sódio para os quatro sistemas estudados, é recomendável que testes sejam realizados com outros sistemas em diferentes condições (especialmente de água residuária), haja vista que existe a possibilidade de aclimação de lodo e provavelmente esses resultados sejam diferentes em cada caso. Contudo, na impossibilidade de ensaios preliminares, recomenda-se o uso do Acetato de Sódio para ensaios que visem a caracterização das condições ideais de comunidades heterotróficas;
- o Fenol e o Acetato de Etila apresentaram toxicidade ao sistema, sendo recomendado, portanto, testes preliminares, caso seja essencial o uso desses substratos ou o lodo não esteja aclimatado;
- o Etanol, apesar de não apresentar comportamento modelo para caracterização das condições ideais (máximas) do metabolismo heterotrófico, provavelmente representa de forma satisfatória a simulação de material orgânico lentamente biodegradável, considerando que o uso do Etanol promoveu uma baixa taxa de utilização de DQO, mas respeitou a recuperação de 100% da fração oxidada;
- apesar da significativa difusão do conceito de que a Glicose seja um modelo representativo de substrato para a fonte de carbono, esse resultado não foi confirmado nessa pesquisa (variando quatro sistemas de lodo ativado), evidenciando a necessidade da realização de testes antes da seleção do substrato que será usado.

REFERÊNCIAS

- AGARRY, S.E.; AUDU, T.O.K.; SOLOMON, B.O. (2009) Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by *Pseudomonas fluorescens* from steady state and wash-out data. *International Journal of Environmental Science & Technology*, v. 6, n. 3, p. 443-450.
- ANDRADE, M.V.F.; SILVA, K.M.L.; SIQUEIRA, J.P.; WANDERLEY, C.R.P.; ARAÚJO, R.S.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K.A. (2013) Azo dye degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in the medium enriched with nitrogen in the presence of primary co-substrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology* (Impresso), v. 56, n. 5, p. 867-874.
- APHA - American Public Health Association; AWWA - American Water Works Association; WEF - Water Environment Federation. (2005) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington, DC: APHA.
- BEM-YOUSSEF, C. & VÁZQUEZ-RODRIGUEZ, G.A. (2011) Model-based design of different fedbatch strategies for phenol degradation in acclimatized activated sludge cultures. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 4, p. 3740-3747.
- CALIK, P.; YILGÖR, P.; AYHAN, P.; DEMIR, A. (2004) Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chemical Engineering Science*, v. 59, n. 22-23, p. 5075-5083.
- CALIK, P.; YILGÖR, P.; DEMIR, A. (2006) Influence of controlled-pH and uncontrolled-pH operations on recombinant benzaldehyde lyase production by *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 5, p. 617-627.
- CASAS, J. (1996) *Producción de Soforolípidos con Candida bombicola*, Thesis, Universidad Complutense, Madrid.
- CATUNDA, S.Y.C.; DEEP, G.S.; VAN HAANDEL, A.C.; FREIRE, R.C.S. (1996) Fast on-line measurement of the respiration rate in activated sludge systems. In: *IEEE Instrumentation and measurement technology conference*. Bruxelas, Bélgica, Junho 4-6, 1996.
- DERKS, Y.M. (2007) *Uso da respirometria para avaliar a influência de fatores operacionais e ambientais sobre a cinética de nitrificação*. (Dissertação) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.
- DJELAL, H.; LARHER, F.; MARTIN, G.; AMRANE, A. (2006) Effect of the dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. *Journal of Biotechnology*, v. 125, n. 1, p. 95-103.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V.E.; MERCHUK, J.C. (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, n. 3, p. 289-307.

- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V.E. (2000) Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 9, p. 680-690.
- GEBREMARIAM, S.Y.; BEUTEL, M.W.; CHRISTIAN, D.; HESS, T.F. (2012) Effects of glucose on the performance of enhanced biological phosphorus removal activated sludge enriched with acetate. *Bioresource Technology*, v. 121, p. 19-24.
- GOMEZ, E.; SANTOS, V.E.; ALCON, A.; GARCIA-OCHOA, F. (2006a) Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chemical Engineering Science*, v. 61, n. 14, p. 4595-4604.
- GOMEZ, E.; SANTOS, V. E.; ALCON, A.; MARTIN, A.B.; GARCIA-OCHOA, F. (2006b) Oxygen uptake and mass transfer rates on growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy & Fuels*, v. 20, n. 4, p. 1565-1571.
- GUJER, W.; HENZE, M.; MINO, T.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. (1999) Activated Sludge Model No. 3. *Water Science and Technology*, v. 39, n. 1, p. 183-193.
- HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OHGAKI, S. (1990) Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Water Research*, v. 24, n. 3, p. 289-296.
- HEIJNEN, J.J. & ROELS, J.A. (1981) A macroscopic model describing yield and maintenance relationships in aerobic fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, n. 4, p. 739-763.
- KOCABAS, P.; CALIK, P.; ÖZDAMAR, T.H. (2006) Fermentation characteristics of L-tryptophan production by thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius* in a defined medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 5, p. 1077-1088.
- LOVANH, N. & ALVAREZ, P.J.J. (2004) Effect of ethanol, acetate, and phenol on toluene degradation activity and tod-lux expression in *Pseudomonas putida* TOD102: evaluation of the metabolic flux dilution model. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 86, n. 7, p. 801-808.
- LIU, Y.S.; WU, J.Y.; HO, K.P. (2006) Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 3, p. 331-335.
- MARSILI-LIBELLI, S. & TABANI, F. (2002) Accuracy analysis of a respirometer for activated sludge dynamic modelling. *Water Research*, v. 36, n. 5, p. 1181-1192.
- MIRANDA, A.C. (2012) Influência da concentração de lodo sobre a capacidade de oxigenação do aerador e a influência da concentração do sal sobre a capacidade metabólica do lodo. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.
- MONOD, J. (1949) The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, p. 371-394.
- MONTES, F.J.; MORENO, J.A.; CATALAN, J.; GALAN, M.A. (1997) Oxygen kinetic and metabolic parameters for the yeast *Trigonopsis variabilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 68, n. 2, p. 243-246.
- RODRIGUES, A.Q. (2005) Caracterização do lodo heterotrófico de sistemas de lodo ativado gerado a partir de esgoto bruto e digerido. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2005.
- RODRIGUES, K.A.; SAMPAIO, G.M.M.S.; ZAIAT, M.; SANTAELLA, S.T. (2007) Influência da glicose sobre o consumo de fenol por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelada. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 2, p. 222-228.
- RODRIGUES, K.A.; VIDAL, C.B.; ANDRADE, M.V.F.; WANDERLEY, C.R.P.; DUARTE, I.S.; MARINHO, G. (2010) Influência da glicose e do inóculo fúngico no tratamento de efluente da castanha de caju. *Conexões: Ciência e Tecnologia*, v. 4, n. 2, p. 42-51.
- ROWE, G.E.; MARGARITIS, A.; WEI, N. (2003) Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1. *Biotechnology Progress*, v. 19, n. 5, p. 1439-1443.
- SANTOS, S.L. (2013) Estudo comparativo dos métodos contínuo e semicontínuo de determinação da taxa de consumo de oxigênio. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2013.
- SCURAS, S.E.; JOBBAGY, A.; GRADY, C.P. (2001) Optimization of activated sludge reactor configuration: kinetic considerations. *Water Research*, v. 35, n.18, p. 4277-4284.
- SILVA FILHO, H.A. (2009) Nitrificação em sistemas de lodo ativado. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2009.
- SOUZA, A.R. (2005) Caracterização do lodo autotrófico de sistemas de lodo ativado gerado a partir de diferentes substratos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2005.
- SPANJERS, H.; TAKACS, I.; BROUWER, H. (1999) Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Water Science and Technology*, v. 39, n. 4, p. 137-145.
- SPANJERS, H. & VANROLLEGHEM, P. (1995) Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Science and Technology*, v. 31, n. 2, p. 105-114.
- VAN HAANDEL, A.C. & CATUNDA, P.F.C. (1982) Determinação da taxa de consumo de oxigênio. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 21, n. 4, p. 481-488.
- VAN HAANDEL, A.C. & MARAIS, G.V.R.O. (1999) *Comportamento do Sistema de Lodo Ativado: Teoria e Aplicações para Projetos e Operações*. Campina Grande: Egraf. p. 472
- VAN HAANDEL, A.C. & VAN DER LUBBE, J. (2012) *Handbook biological wastewater treatment: design and optimization of activate sludge systems*. London: IWA Publishing