

CARACTERIZAÇÃO BASEADA EM EFEITOS – PARTE II

Dione Mari Morita

Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental

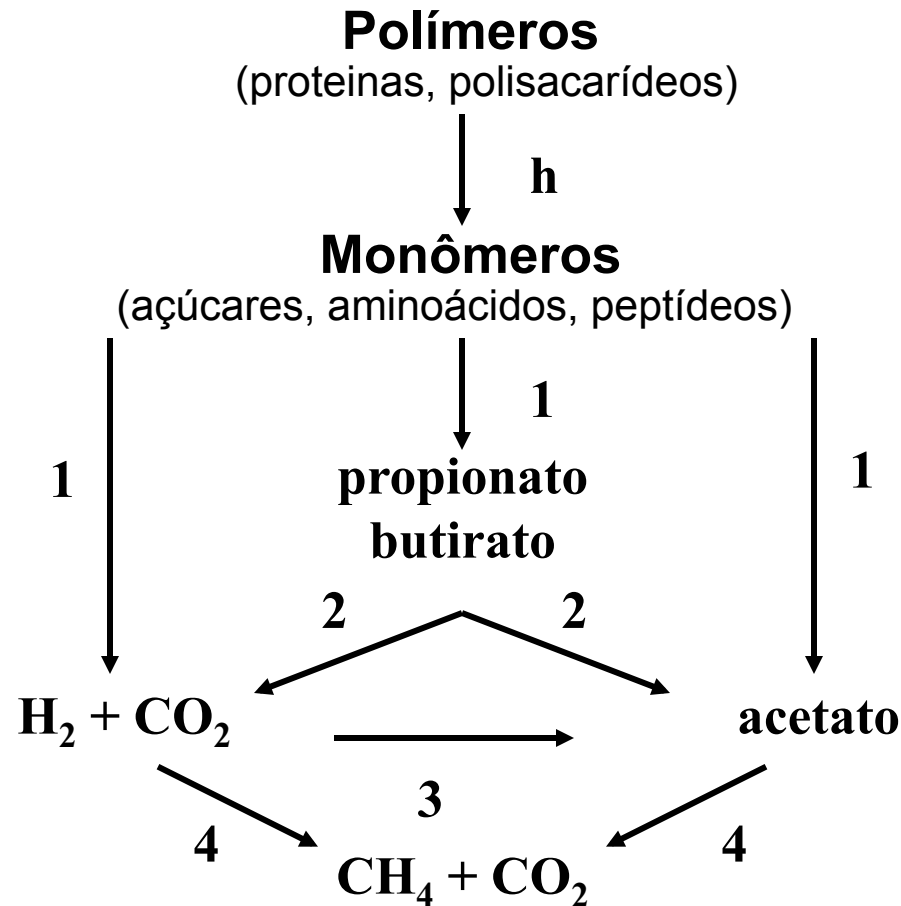
Escola Politécnica da Universidade de São Paulo

TESTE DE TOXICIDADE EM MEIO ANAERÓBIO

Profa. Dra. Dione Mari Morita

Biodegradação anaeróbica

Consórcio
Metanogênico



h Hidrólise

1 Bactérias fermentativas

2 Bactérias acetogênicas

3 Bactérias hidrogenotróficas

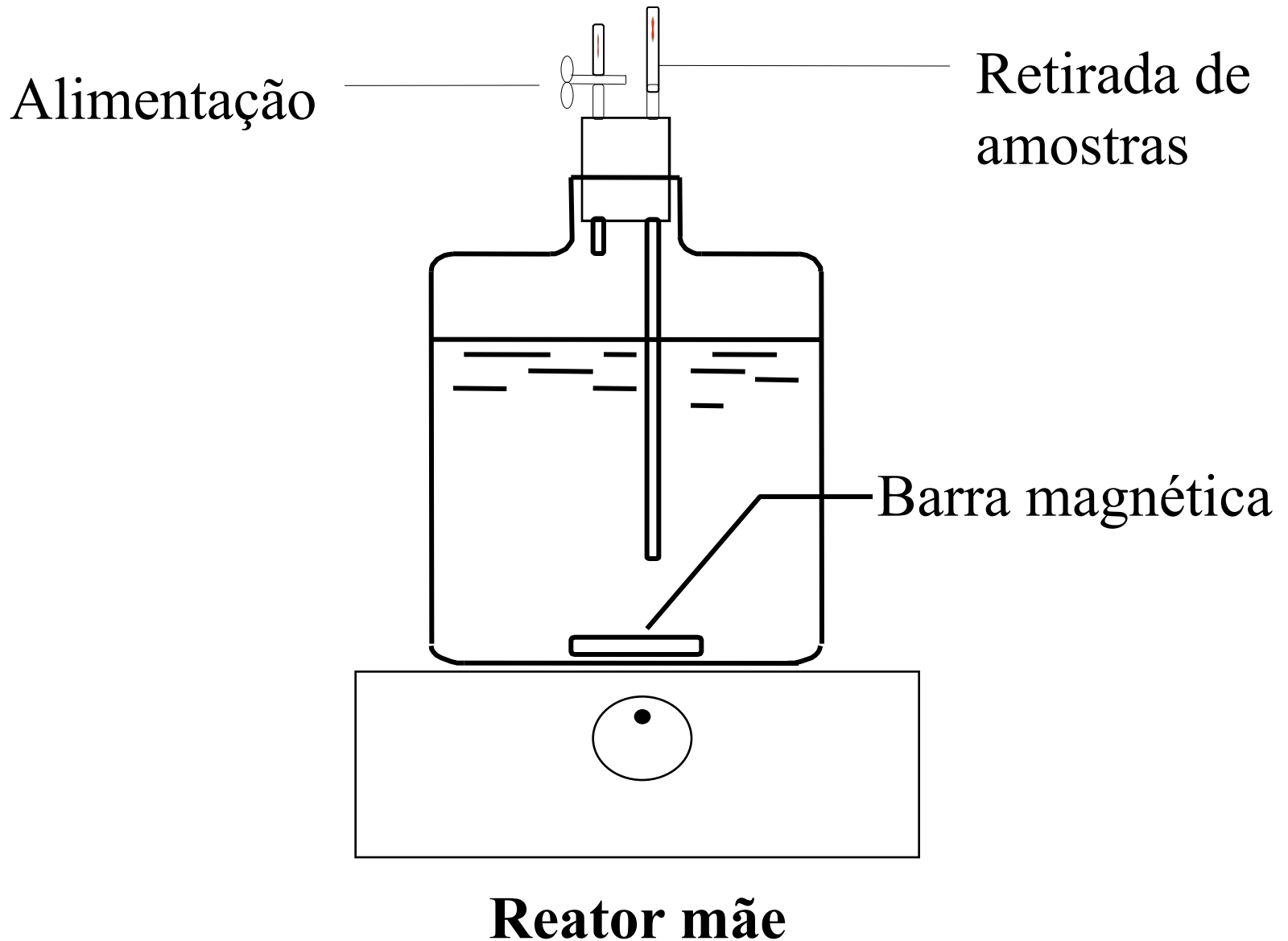
4 Arquéias Metanogênicas

YOUNG; TABAK

- **Nível 1** - avaliar o efeito do poluente tóxico sobre as transformações de um substrato básico (etanol);
- **Nível 2** - Avaliar o efeito do poluente tóxico sobre a cinética das transformações acetogênicas e metanogênicas do substrato básico;
- **Nível 3** - determinação da cinética das reações e transformações do poluente tóxico. A cultura é adaptada e os parâmetros cinéticos são obtidos pela medida do residual tóxico e pela produção de metano, sob condições controladas;

- **Nível 4** - ainda em desenvolvimento e consiste na avaliação do efeito de misturas de poluentes tóxicos sobre as transformações, em meio anaeróbio, do substrato básico (etanol);
- **Nível 5** - ainda em desenvolvimento e refere-se ao estudo de tratabilidade de águas residuárias industriais contendo poluentes tóxicos em meio anaeróbio.

YOUNG; TABAK



Nível 1

- Reator-mãe: Frasco de 3 a 12 litros
 - tempo de detenção hidráulico: 20 dias;
 - Temperatura: 35 °C;
 - carga orgânica aplicada: 1 g DQO/L.dia.
- Reatores alimentados uma vez ao dia (retirada de 5% do volume), seguida pela adição de igual volume de solução estoque de alimentação (DQO de 20.000 mgO₂/L) - etanol dissolvido no meio de cultura.
- Transferência de 100 a 400 mL da cultura do reator-mãe para reatores-teste (150 a 500 mL).

Composição do meio de cultura

Nutrientes:	
KH ₂ PO ₄	500
Na ₂ SO ₄	150 ^a
NH ₄ Cl	530
cisteína	100 ^b
Tampão:	
NaHCO ₃	6000
Sais minerais:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
MgCl ₂ .6H ₂ O	200
FeCl ₂ .4H ₂ O	20
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,50
H ₃ BO ₃	0,25
ZnCl ₂	0,25
CuCl ₂	0,15
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,50
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,25
Na ₂ SeO ₄	0,25

a - 150 mg Na₂SO₄/L corresponde a 5 mg SO₄²⁻/1000 mg DQO.

b - 100 mg cisteína/L representa 5 mg cisteína/ 1000 mg DQO.

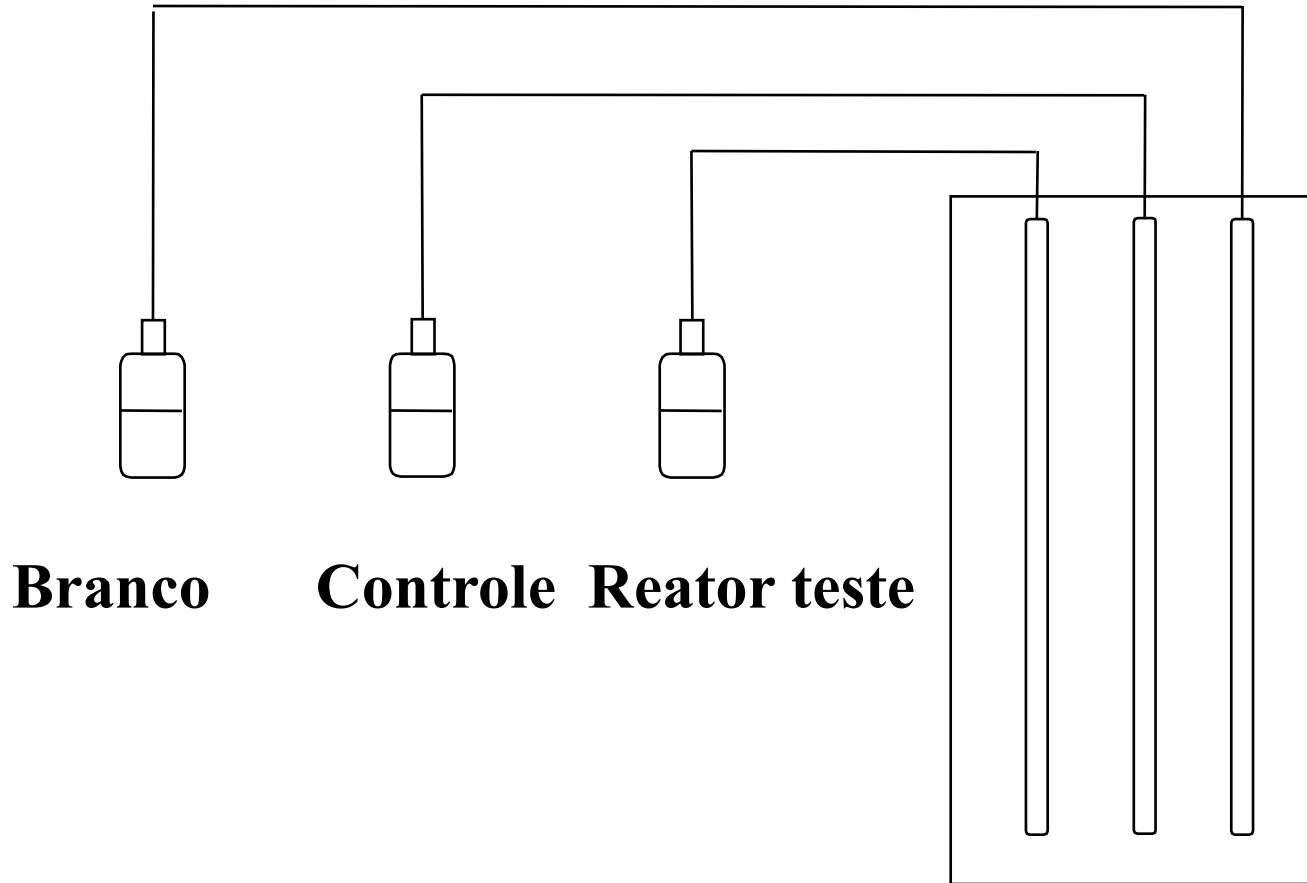
- reatores-teste operados da mesma forma que o reator-mãe por 3 a 5 dias
- escolhidos aqueles que consistentemente produzem a quantidade esperada de gás
- Os reatores-testes escolhidos são dosados com o substrato e o poluente tóxico.

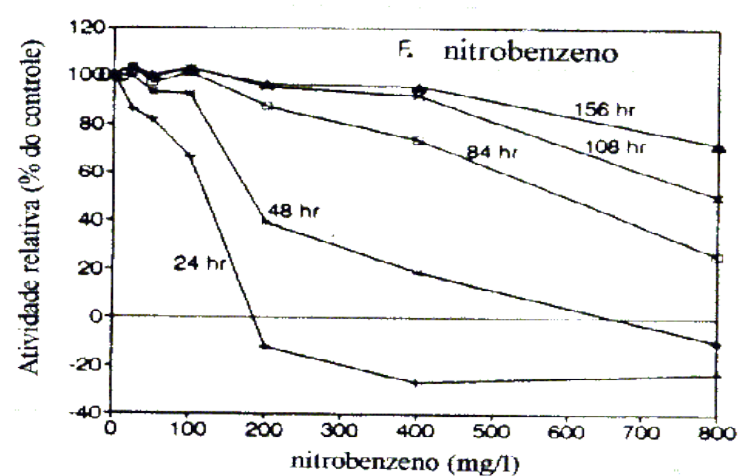
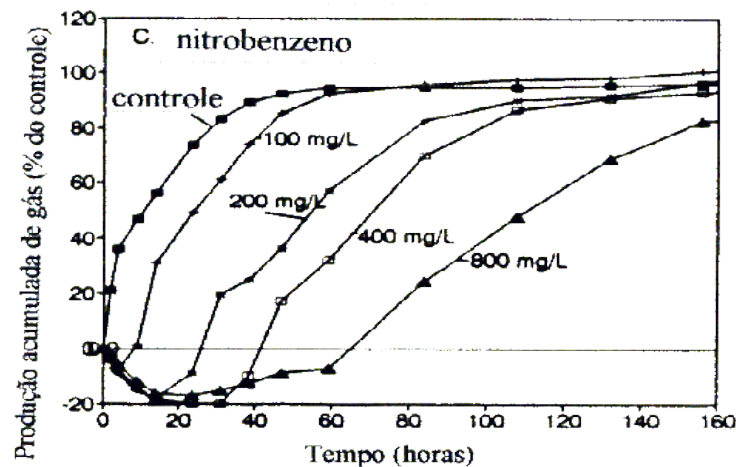
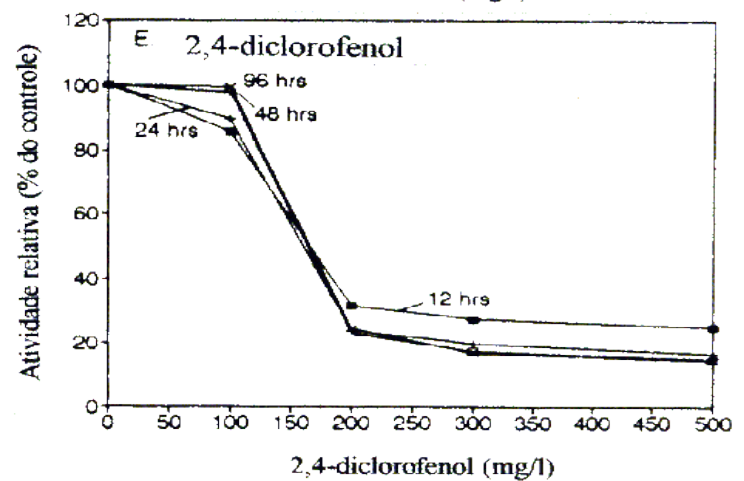
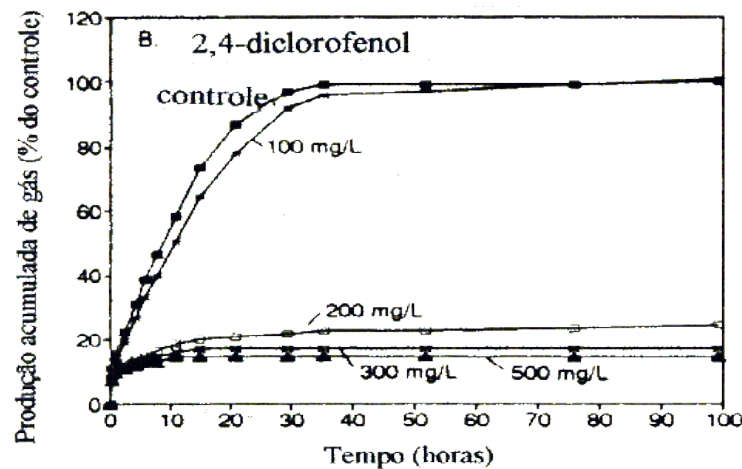
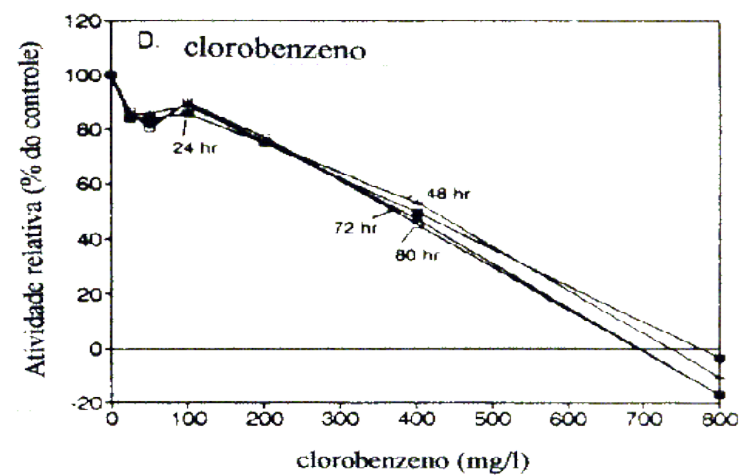
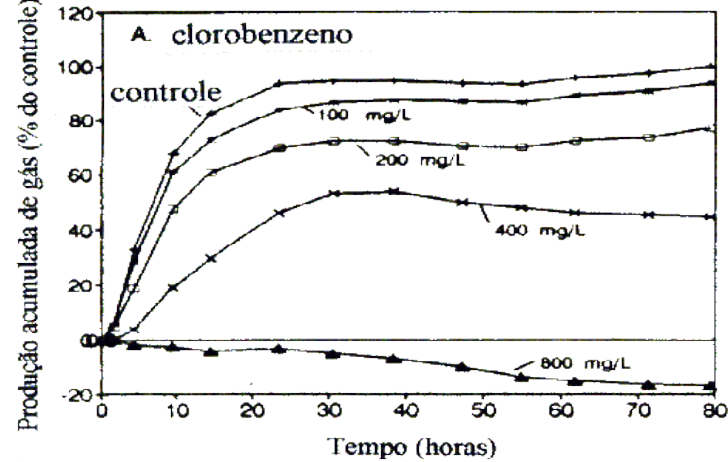
Sub-nível 1

- poluente tóxico introduzido nos reatores-teste em seis a oito concentrações diferentes
- Ao menos uma concentração é repetida para garantir um controle de qualidade.
- prova em branco (somente inóculo)
- reator-controle, onde não é adicionado o poluente tóxico.
- produção de gás medida num período superior a 5 dias.

$$AR(\%) = \left(\frac{\text{produção acumulada de gás nos reatores-testes no instante } t}{\text{produção acumulada de gás no reator-controle no instante } t} \right) \cdot 100$$

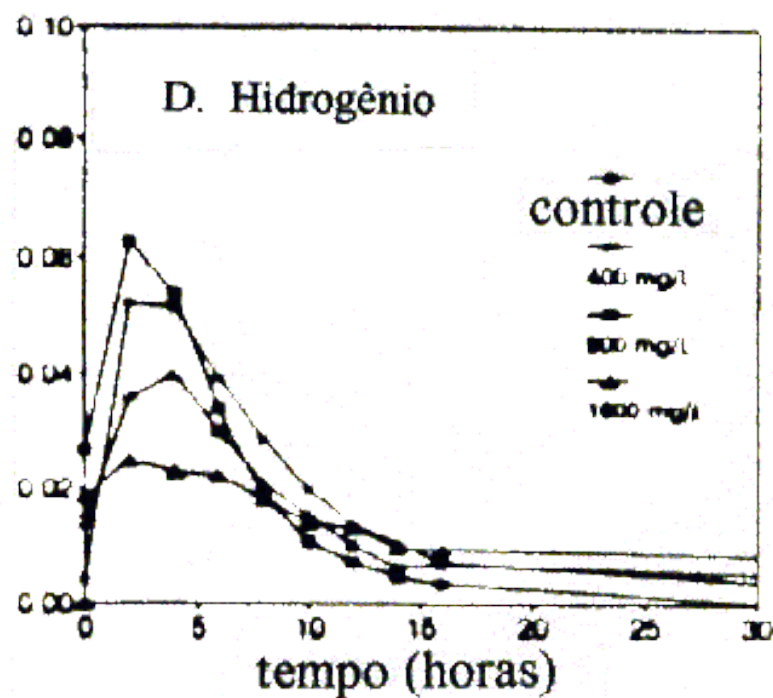
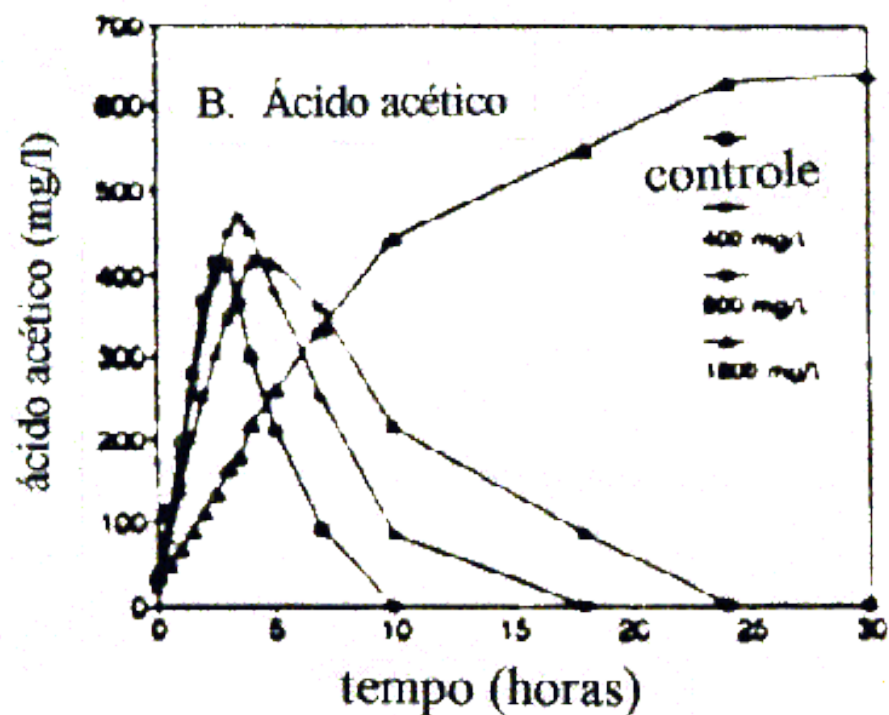
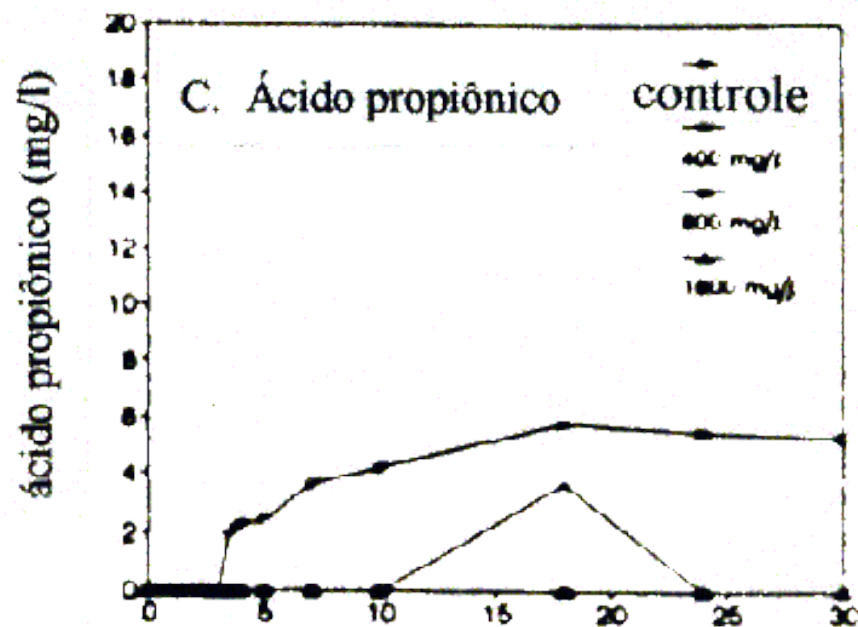
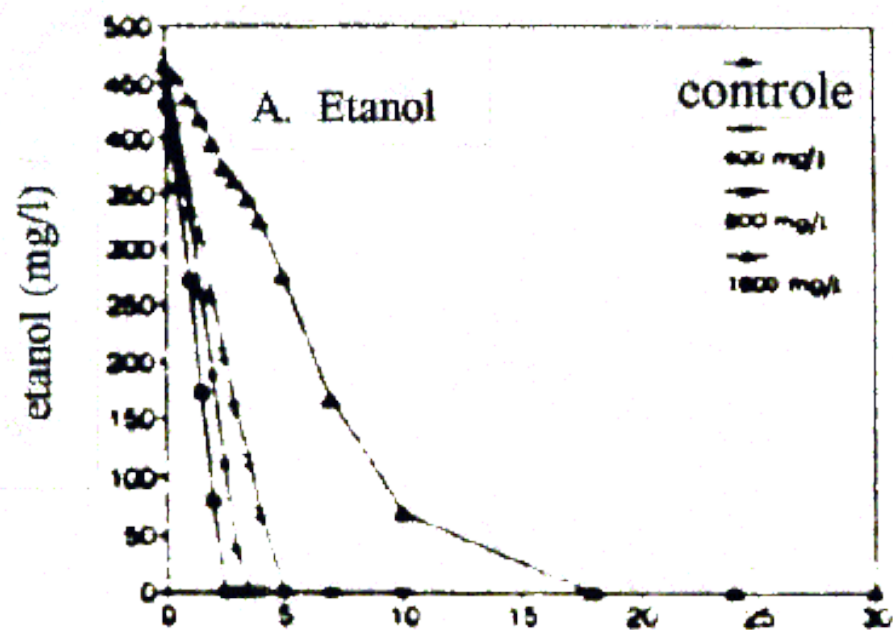
YOUNG; TABAK





Sub-nível 2

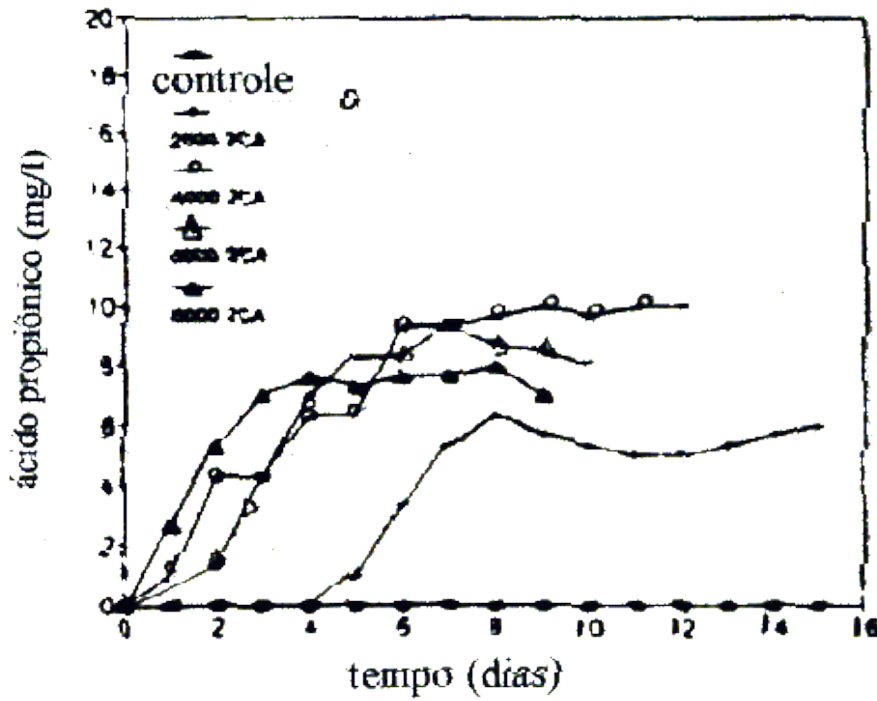
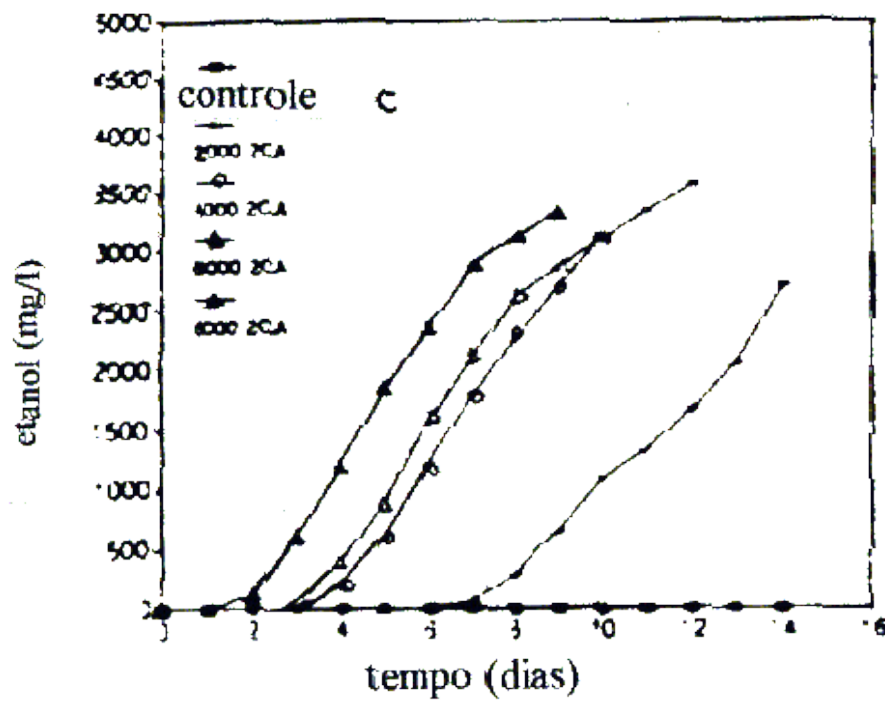
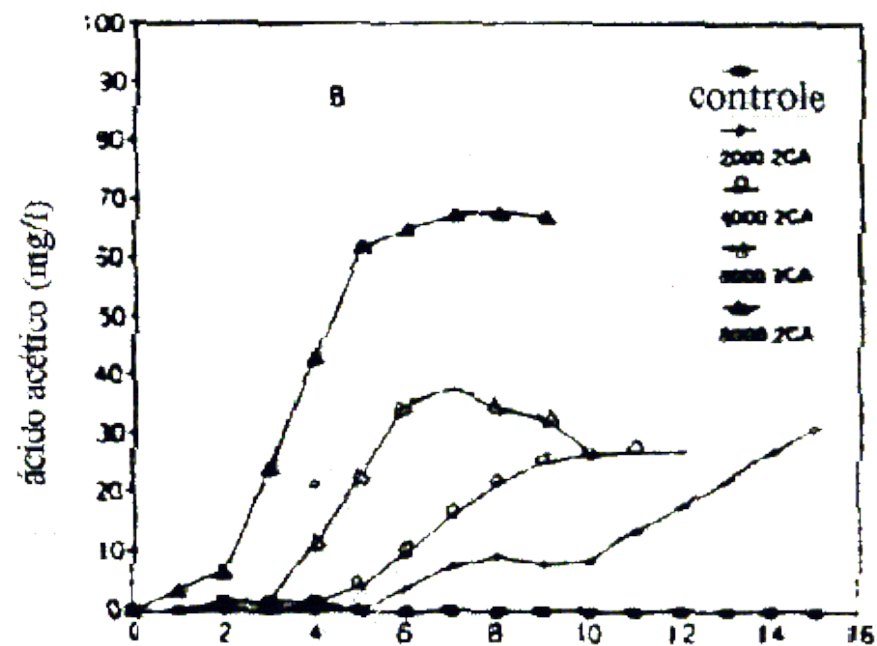
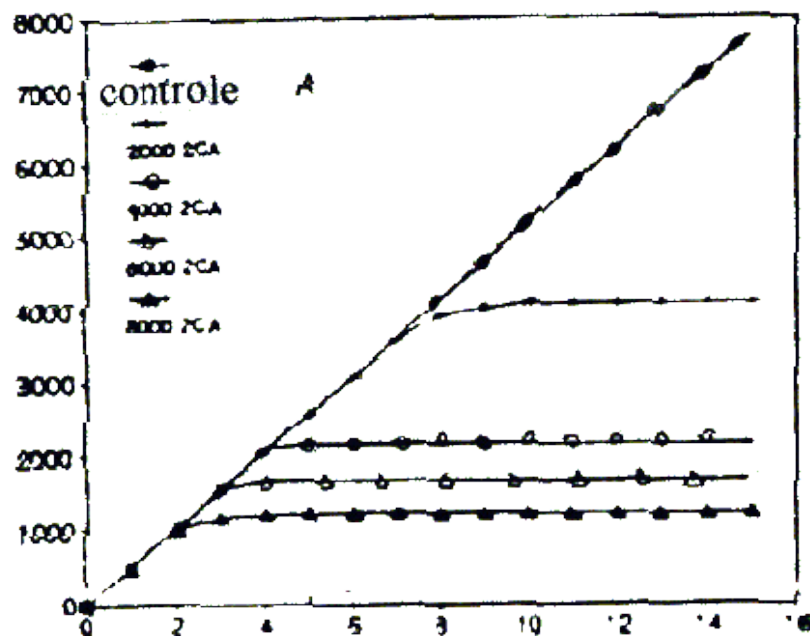
- poluente tóxico adicionado nos reatores-teste em três concentrações (atividades relativas iguais a 75, 50 e 25% das determinadas no sub-nível 1).
- Amostras de 10 mL são retiradas de cada reator-teste em intervalos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 96 e 120 horas.
- Em cada um destes intervalos de tempo, determinam-se as concentrações do substrato solúvel (etanol e ácidos orgânicos) e em alguns casos, o residual do poluente tóxico.
- As culturas não são adaptadas ao poluente tóxico



Sub-nível 3

- Em 4 a 5 reatores-teste, adiciona-se etanol mais o poluente tóxico - concentrações de 2 a 10 vezes àquela que representa 50% da atividade relativa de 24 horas, obtida no sub-nível 1.
- reator-controle e reator em duplicata.
- culturas não são adaptadas ao poluente tóxico
- substrato básico mais o poluente tóxico são introduzidos uma vez por dia após a retirada de 5% do volume do conteúdo do reator- teste.
- produção de gás e concentrações de etanol e ácidos orgânicos monitoradas diariamente.
- reatores operados até cessar a produção de gás (aproximadamente 15 dias).
- determinados os residuais dos poluentes orgânicos tóxicos voláteis na fase gasosa.

Produção acumulada de gás (ml) @ 1 g DQO/dia



Nível 2

- reatores-teste fluxionados com uma mistura de 70% de nitrogênio e 30% de dióxido de carbono.
- transferir a cultura do reator-mãe para os reatores-teste
- Re-fluxionar com a mistura de nitrogênio e dióxido de carbono
- selar imediatamente e manter por um período de 3 a 5 dias.
- introduzir o substrato básico e o poluente tóxico (concentrações correspondentes às atividades relativas de 24 horas iguais a 25, 50 e 75%)
- reatores-teste incubados por 24-48 horas ou até que se completem as reações.
- realizam-se as análises por cromatografia gasosa.

- 10 a 15 mL removidos através do septo de borracha em determinados intervalos de tempo e transferidos para frascos selados com septo contendo uma gota de uma solução de 16 g/l de cloreto de mercúrio.
- Amostras centrifugadas por 15 minutos.
- centrifugado transferido para frascos de 4 a 8 ml contendo 1 gota de ácido sulfúrico.

$$\frac{dM}{dt} = y \left(\frac{k \cdot S \cdot M}{k_s + S} \right) - k_d \cdot M$$

onde:

dS/dt - taxa de utilização do substrato (mg/L.h);

dM/dt - taxa de crescimento “líquido” dos micro-organismos (mg/L.h);

M - concentração de micro-organismos ativos (mg/L);

S - concentração de substrato (mg/L);

k - máxima taxa de utilização específica de substrato (mg DQO/mg SSV.h);

k_s - coeficiente de saturação (mg/L);

y - coeficiente de síntese celular (mgSSV/mgDQO convertida) e

k_d - coeficiente de auto-destruição dos micro-organismos (h^{-1}) – 0,024 dia⁻¹.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{k_0 \cdot (k^*) \cdot S \cdot M}{k_{S0} (k_S^*) + S}$$

$$k^* = \left(1 - \frac{I}{I^*}\right)^n$$

$$k_S^* = \left(1 - \frac{I}{I^*}\right)^m$$

I - concentração do poluente tóxico (mg/L);

I^* - a concentração do poluente tóxico que causa completa inibição (mg/L)

m, n - expoentes.

- Para poluentes voláteis - calcula-se a concentração real do poluente tóxico na solução através da lei de Henry.

Nível 3 – sub-nível 1: Adaptação da cultura

- reator-mãe alimentado uma vez por dia.
- taxa de alimentação do poluente tóxico típica: 0,5 a 1,0% da taxa de alimentação do etanol ou 5 a 10 mg de poluente tóxico/L.dia.
- Adaptação: poluente tóxico introduzido no reator em concentrações gradativamente crescentes
- Co-substrato: ácido benzóico, por exemplo.
- regime estabilizado - após 60 dias da adaptação.

Sub-nível 2 – Biodegradação do poluente tóxico

- pelo menos 6 reatores são operados em batelada numa taxa biomassa ativa/substrato de aproximadamente 1:100.
- culturas adaptadas são transferidas do reator-mãe, sob condições anóxicas, para os reatores-teste
- Reatores-teste operados por 3 a 5 dias usando solução de etanol e o poluente tóxico como alimentação.
- controle: reator-teste que possui somente o inóculo
- controle abiótico: reator teste que recebe 160 mg/L de cloreto mercúrico.

- poluente tóxico introduzido nos reatores-teste em 3 a 4 concentrações diferentes (uma duplicata) -concentrações correspondentes às atividades relativas de 10, 20, 40 e 60%.
- residual tóxico medido diariamente
- monitoramento cuidadoso da composição do gás do “headspace”

Sub-nível 3: obtenção dos parâmetros cinéticos

Equações do nível 2, substituindo:

$$k^* = 1,0$$

$$k_S^* = 1 + \frac{I^2}{k_h \cdot k_{S0}}$$

I - concentração do substrato tóxico

k_h , - coeficiente de inibição de Haldane.

- Determinação da biomassa responsável pela degradação do poluente tóxico e do coeficiente de síntese celular:
 - Calcular o coeficiente de síntese total usando métodos bioenergéticos e corrigi-lo pela contribuição dos intermediários à biomassa total;
 - Considerar que o coeficiente de síntese para o poluente tóxico seja o mesmo que àquele para a conversão acetogênica de compostos que tenham composição estrutural semelhante;
 - Considerar que o coeficiente de síntese para a conversão acetogênica do poluente tóxico seja a mesma que àquela do etanol, com base na DQO.
- Nenhuma das alternativas é aplicável a compostos parcialmente degradados.

BMP (Biochemical Methane Potential)

- Determinação da concentração de compostos orgânicos convertidos a metano em meio anaeróbio
- Avaliar a eficiência do tratamento anaeróbio a um despejo específico
- Determinar a quantidade residual de matéria orgânica para posterior tratamento
- ASTM E2170-01/ISO 11714

Quantidade de substrato para produção necessária de metano

- No mínimo 100 a 150 mL CH₄/frasco ou 165 a 250 mL de biogás com 60% de metano
- Usar DQO do substrato para determinar o volume de substrato a ser introduzido no frasco. Considerar:
 - 1 g DQO removido = 395 mL CH₄;
 - 70% de remoção de DQO.

Para 125 mL de CH₄ são necessários 221,5 mg DQO

Cálculo da massa de substrato a ser introduzida no frasco

$$221,5 \text{ mgDQO} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{X \text{ mgDQO}} = Y \text{ mL de substrato}$$

$$Y \text{ mL de substrato} \cdot \frac{Z \text{ mgSV}}{1000 \text{ mL}} = A \text{ mgSV}$$

X = massa de DQO do substrato (mg)

Y = volume de substrato necessário para obter a produção de CH₄ (mL)

Z = concentração de SV do substrato (mg/L)

A = massa de substrato para obter a produção necessária de CH₄

Cálculo do volume de inóculo ($V_{\text{inóculo}}$) a ser introduzido no frasco

$$V_{\text{inóculo}} \text{ (mL)} = \frac{Y \text{ mL substrato} \cdot Z \text{ mgSV/L}}{B \text{ mgSV/L}} = C \text{ mL inóculo}$$

$$C \text{ mL inóculo} \cdot \frac{B \text{ mgSV}}{1000 \text{ mL}} = D \text{ mgSV inóculo}$$

Y – volume de substrato necessário para obter a produção de CH_4

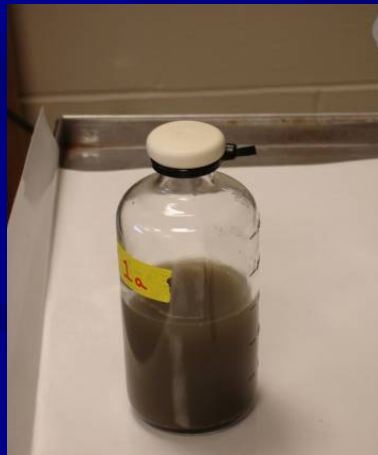
Z – concentração de SV do substrato (mg/L)

B – concentração de SV do inóculo (mg/L)

C – volume mL inóculo considerando relação 1:1

D – massa de inóculo considerando relação 1:1

- Inserir nutrientes
- Fluxionar os frascos com mistura contendo 30% de CO_2 e 70% N_2 ;
- Selar os fracos;
- Colocar os frascos em shaker, a temperatura = 35°C , por 30 dias.
- Branco: somente inóculo + nutrientes



Diariamente medir:

- a produção de biogás;
- a porcentagem de metano

Triplicatas

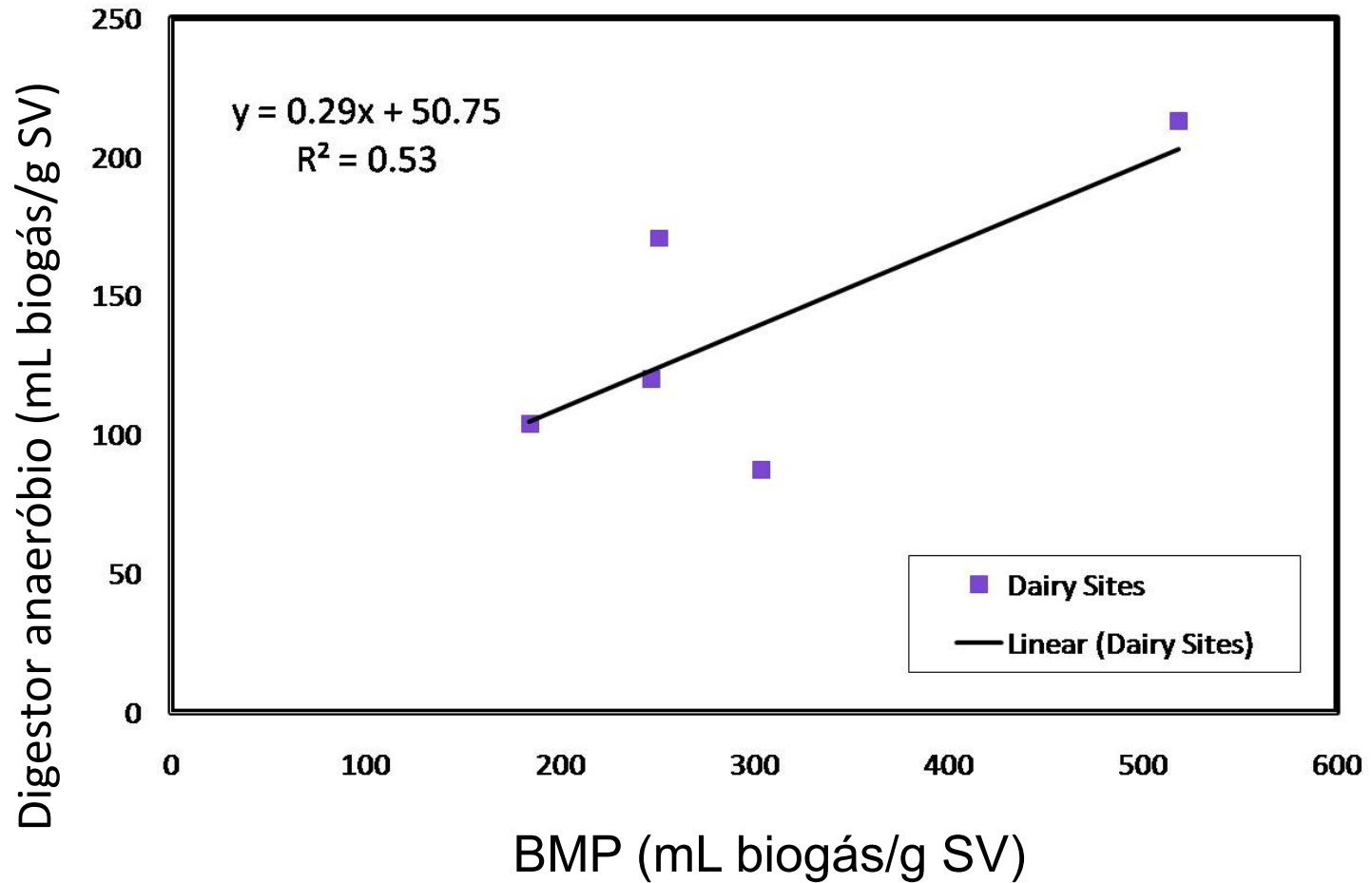


Produção de metano

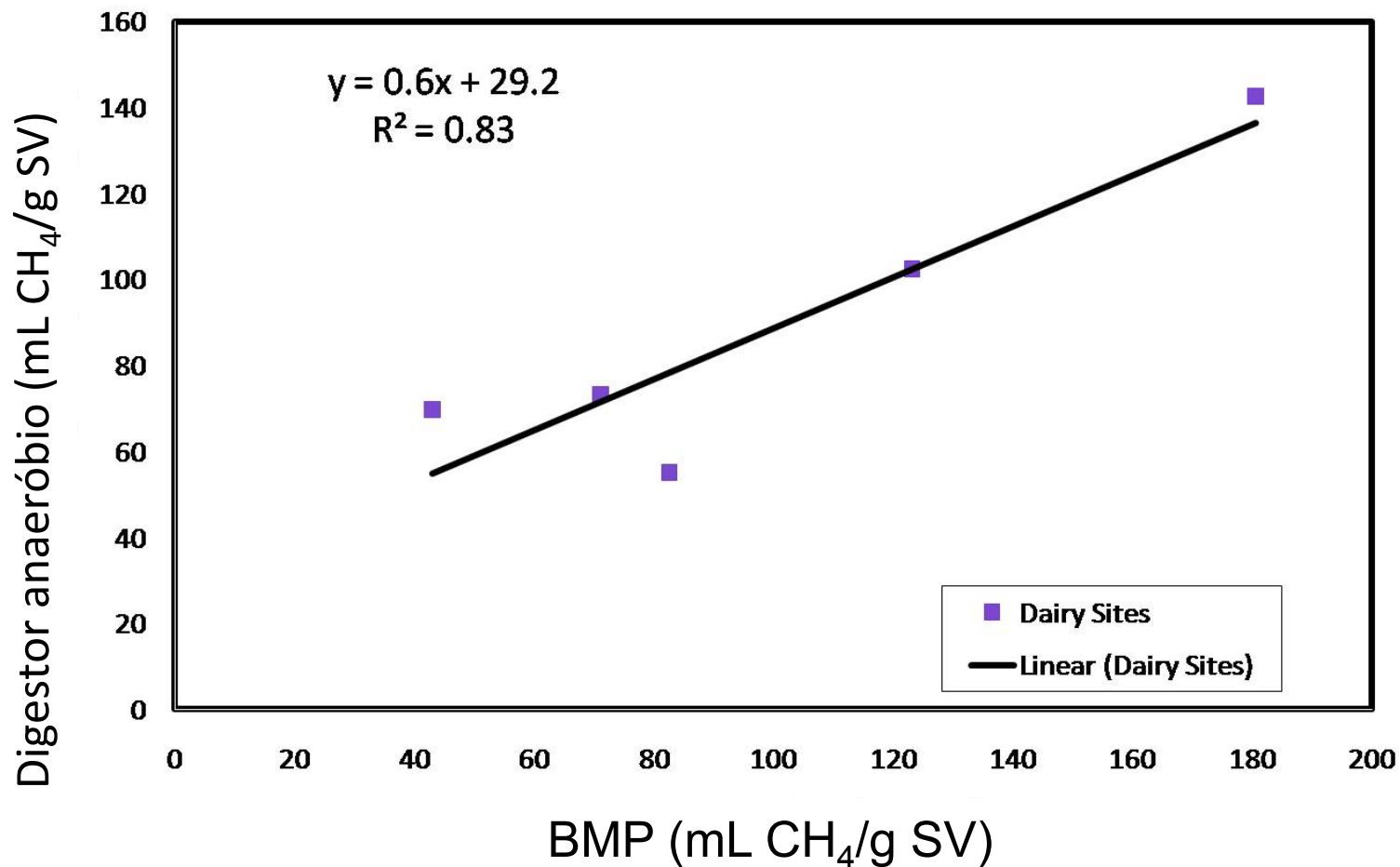
- Normalizar a produção de biogás e de metano para comparar diferentes substratos
- Normalizar para mL/gSV no substrato

$$\text{Produção normalizada de CH}_4 = \frac{\text{mL de CH}_4 \text{ produzido}}{\frac{\text{g SV substrato}}{\text{mL}} \cdot \text{mL substrato no frasco}}$$

BMP versus escala real



BMP versus escala real



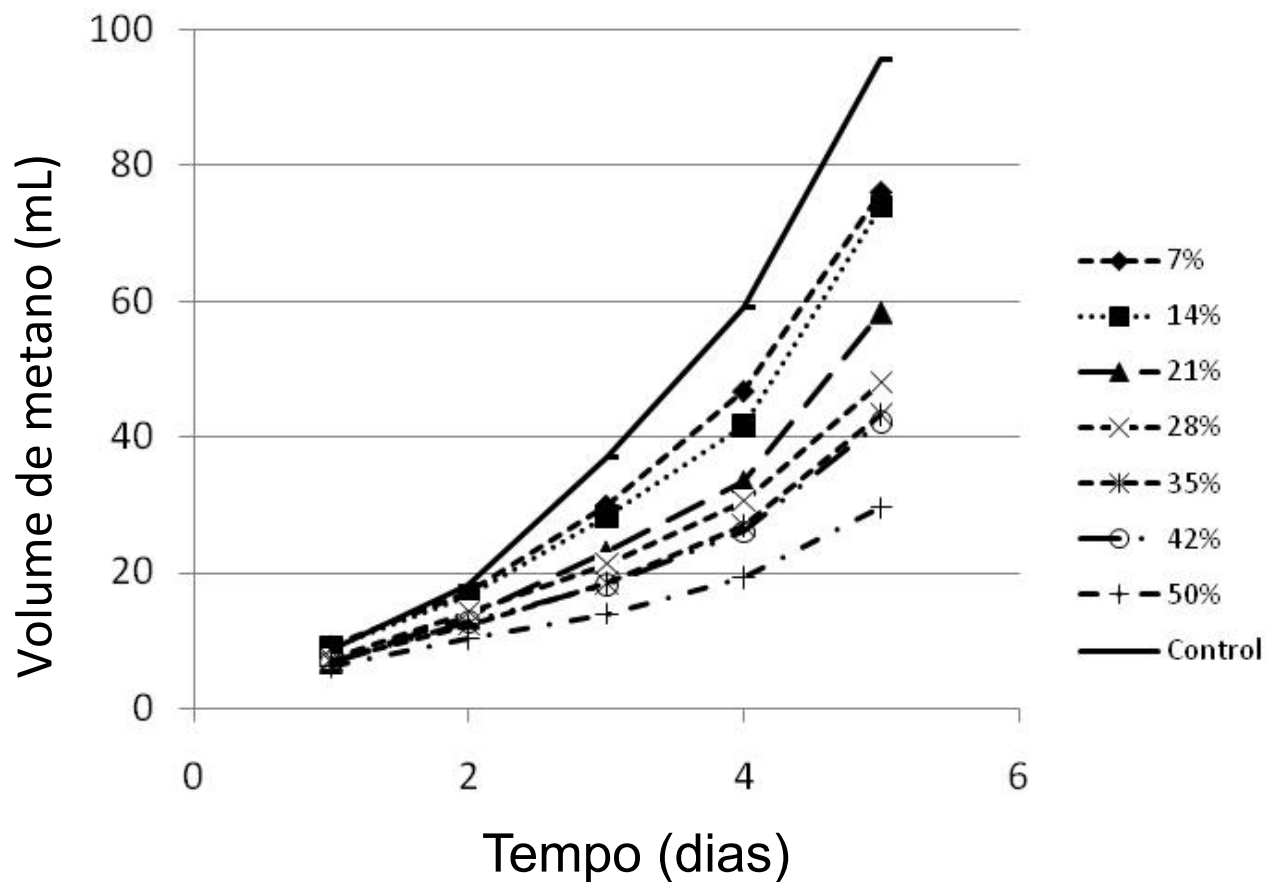
Testes de toxicidade em meio anaeróbico

- ISO 13641-1
- Medir pH, DQO, sólidos totais e sólidos voláteis da água residuária
- Inserir nos frascos 2 a 4 g de inóculo
 - 100 mL de sólidos com uma concentração de 20 a 40 g/L
- Adicionar 2 mL de substrato
 - Mistura padrão de nutrientes, extrato de levedura e d-glucose
- Adicionar o material teste

- Fluxionar os frascos com mistura de 30% CO₂ e 70% de N₂
- Selar e inserir os frascos em shaker em 35°C por 3 a 5 dias
- Medir diariamente a produção de biogás e % de CH₄



Produção acumulada de metano



- Selecionar um tempo em que a curva é linear (normalmente 48 horas) e calcular a % de inibição:

$$I = \left(1 - \frac{\text{CH}_4 \text{ teste}}{\text{CH}_4 \text{ controle}}\right) \cdot 100$$

- I – porcentagem de inibição
- CH₄ teste – volume de CH₄ no teste em um dado tempo
- CH₄ controle – volume de CH₄ no controle em um dado tempo

Cálculo do EC_{50}

% de inibição em 72 horas

