

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

**ESTRUTURA, CARACTERIZAÇÃO E CINÉTICA DE LODO  
ANAERÓBIO IMOBILIZADO EM ESPUMA DE POLIURETANO  
TRATANDO SUBSTRATO SINTÉTICO CONTENDO  
PROTEÍNA COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO**

**GIOVANA TOMMASO**

DEDALUS - Acervo - EESC



31100008579



Dissertação apresentada à  
Escola de Engenharia de  
São Carlos da Universidade de  
São Paulo, como parte dos  
requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Hidráulica e  
Saneamento

**ORIENTADOR: PROF. DR. EUGENIO FORESTI**

SÃO CARLOS  
SETEMBRO, 1999

Class.	TESE-EESC
Cutt.	6064
Tombo	058/00

311 00008579

S/S 1072972

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

T661e Tommaso, Giovana  
Estrutura, caracterização e cinética de lodo anaeróbio imobilizado em espuma de poliuretano tratando substrato sintético contendo proteína como única fonte de carbono / Giovana Tommaso. -- São Carlos, 1999.

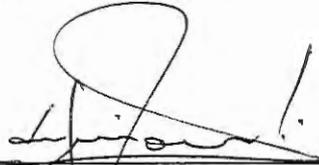
Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1998.  
Área: Hidráulica e Saneamento.  
Orientador: Prof. Dr. Eugenio Foresti.

1. Degradação anaeróbia de proteínas.  
2. Desenvolvimento de biofilme. 3. Cinética. I.  
Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

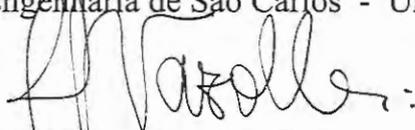
Candidata: Engenheira **GIOVANA TOMMASO**

Dissertação defendida e aprovada em 21-10-1999  
pela Comissão Julgadora:



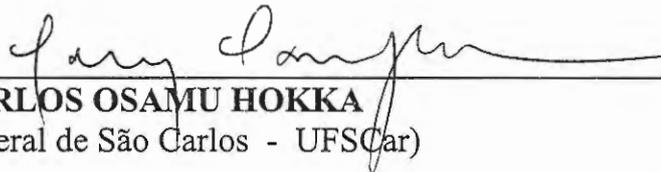
---

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI (Orientador)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



---

Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER**  
(Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello")



---

Prof. Doutor **CARLOS OSAMU HOKKA**  
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



---

Prof. Associado **EDUARDO CLETO PIRES**  
Coordenador da Área de Hidráulica e Saneamento



---

**JOSÉ CARLOS A CINTRA**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

*Ao Paulo e ao Enzo,  
que chegaram e encheram meu coração, dedico.*

*Em homenagem ao Vovô Emílio, que me manda as boas idéias, ao Vovô Fausto que  
sempre as incentivou, à Tia Tânia pela força e o carinho e à  
Vovó Lúcia que me ensinou tanta coisa...  
Pena que vocês precisaram ir tão cedo...*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eugenio Foresti, por TUDO ... Por ter tornado possível, por ter dado principalmente a segurança. Na minha formação, uma pessoa muito IMPORTANTE.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat que me acolheu e me ajudou desde o primeiro momento, além de ter coorientado na parte da cinética. Como diria o João, GRAAANDE MARCELO!!

À Maria Bernadete Varesche, não sei nem como agradecer... por tudo, tudo, valeu mesmo, Berna, por também ter coorientado na parte da microbiologia.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Blundi, pela orientação e amizade no início deste caminho.

Aos Professores: Marcelo Pereira, Luiz Daniel, J. R. Campos e Rozana F. Vazoller, pelas maravilhosas aulas, por terem aberto minha mente em relação e direção ao meio ambiente.

À Pavi e Sá, pela ajuda tão importante sempre que puderam.

Ao Sr. Gallo, que com seu talento ao microscópio eletrônico, possibilitou parte dos melhores resultados desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Rosana e ao Prof Hokka pelas valiosíssimas contribuições na correção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi (chefe querido) que me iniciou nesse caminho, e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iracema de Oliveira Moraes por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. 'Tio'Mário Benincasa, meu amigo, por sempre me incentivar ao longo do caminho.

Aos Prof. Dr. João Cláudio Thomeo, e Prof (quase) Dr. Roger Darros Barbosa, pela amizade, e por terem colocado fé.

Ao Prof. Trajano pelo aviso na hora certa.

A todo o pessoal com quem eu convivi durante o trabalho experimental: Lorena (orientadora de laboratório), Patrícia, Lyda, Prof. Beth, Janja, Elo, Claudião, Chico Vela (obrigado pela herança de alguns aparatos experimentais), Cido, Margarida, Ivana e quem mais eu não me lembro, não por falta de importância, mas por falta de memória... Essas pessoas sempre tiveram algo bom para falar... a respeito da pesquisa, a respeito da vida... e assim importantes amizades nasceram.

Aos amigos muito queridos de desde o início do mestrado: Sérgio, Sil, Rê, Alê, Déa, Guilherme, Marcus, Grego, Werner, Fazollo, Sérgio L. e Karen, pessoas que eu não imaginava encontrar, por tudo, tudo, o que aconteceu...

À Maria, Gabi, Lucia e Lú que continuaram por aqui... amigas para sempre.

Ao Sr. José e Dna. Ivete, meus pais em São Carlos, no primeiro ano de mestrado.

Ao Giovanni, INENARRÁVEL força com as fotos desse trabalho.

À Dna. Inês, Seu Zé, Su, Amália, Gê, Cida e Vera, por terem me acolhido como se eu já fosse da família.

À Edith, pela força do parto, e a Cynthia pelo parto, parte tão importante desse caminho.

À Beth que me ajudou com o Enzo para que eu pudesse escrever.

À minha mãe querida, que sempre esteve por aqui quando eu precisei, e que faz tanta falta quando não está.

Ao meu paizão, que mesmo a distância sempre deu o apoio e a segurança para eu poder caminhar.

À Tici e ao Hélio, os irmãos mais lindos que alguém podia ter, que desde a sua chegada deixaram a vida mais divertida e que me ajudaram a ser o que eu sou.

Ao Cnpq pela bolsa consedida.

Enfim, a todos que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para eu estar vivendo um momento tão gostoso 😊

*'Nos tempos atuais, nosso Planeta Mãe parece estar nos Dizendo:  
Minhas crianças, minhas queridas crianças, comportem-se de um  
Modo mais harmonioso. Minhas crianças, por favor, cuidem de mim'  
(Dalai Lama, In Environmental Ecology, B. Freedman, 1995 apud Vazoller, 1995)*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>ix</b>
ABREVIATURAS .....	x
<b>RESUMO</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
3.1. PROTEÍNAS .....	5
3.1.1. GELATINA.....	7
3.1.2. ESTRUTURA PROTÉICA.....	8
3.1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	10
3.2. DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE PROTEÍNAS .....	11
3.2.1. HIDRÓLISE PROTÉICA .....	11
3.2.2. FERMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	13
3.2.3. BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS .....	15
3.3. SISTEMAS DE BIOMASSA FIXA.....	18
3.3.1. MATERIAIS SUPORTE .....	19
3.3.2. BIOFILME - INSTALAÇÃO E EVOLUÇÃO .....	22
3.3.3. CINÉTICA DE BIOFILMES .....	24
3.3.4. COMPOSIÇÃO ESTRUTURA DO BIOFILME.....	26
3.3.5. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM BIOFILMES .....	28
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. DESCRIÇÃO DOS REATORES DIFERENCIAIS.....	31
4.2. MATERIAL SUPORTE .....	31

4.3. SUBSTRATO.....	31
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	32
4.4.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY MODIFICADO POR PETERSON (1997).....	32
4.5. EXAMES SOB MICROSCOPIA.....	33
4.5.1. EXAME SOB MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	33
4.5.2. EXAMES DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ COMUM.....	33
4.6. DESENHO EXPERIMENTAL.....	34
4.6.1. ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE SUBSTRATO SINTÉTICO CONTENDO GELATINA COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO (lodo proveniente de RHALF de bancada – Sarti, 1998). .....	34
4.6.2. ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME ANAERÓBIO PROTEOLÍTICO .....	38
4.6.3. PROCEDIMENTO DE TROCA DE ATMOSFERA.....	40
4.6.4. PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM.....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
5.1. ENSAIO DE ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE GELATINA (com lodo proveniente de RHALF tratando substrato sintético simulando esgoto sanitário).....	42
5.1.1. PERÍODO DE ADAPTAÇÃO.....	42
5.1.2. PERÍODO DE OPERAÇÃO.....	46
5.2. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE GELATINA (com lodo cultivado em RHALFd degradando substrato sintético a base de gelatina como principal fonte de carbono)76	76
5.3. EXAMES SOB MICROSCOPIA.....	81
5.3.1. ENSAIO EXPLORATIVO .....	81

5.3.2. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LODO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE GELATINA (com lodo proveniente de RHALF tratando substrato sintético simulando esgoto sanitário (Sarti, 1998)).....	83
5.3.3. EXAMES SOB MICROSCOPIA DE FORMAÇÃO E EVOLUÇÃO POPULACIONAL DO BIOFILME PROTEOLÍTICO .....	85
5.3.3.1. Observação microscópica do reator aberto no 6º dia de operação .....	89
5.3.3.2. Observação microscópica do reator aberto no 11º dia de operação .....	92
5.3.3.3. Observação microscópica do reator aberto no 16º dia de operação .....	94
5.3.3.4. Observação microscópica do reator aberto no 22º dia de operação .....	948
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>7.RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	hidrólise protéica, adaptado de SCHIAVUZZO, (1997).....	12
FIGURA 4.1	Esquema do aparato experimental utilizado na determinação de parâmetros cinéticos aparentes da degradação anaeróbia de gelatina de lodo previamente imobilizado.....	35
FIGURA 4.2	Esquema do aparato experimental para o acompanhamento da formação do biofilme proteolítico.....	39
FIGURA 4.3	Ilustração do procedimento de troca de atmosfera.....	36
FIGURA 5.1	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para a primeira batelada de adaptação.....	43
FIGURA 5.2	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para a segunda batelada de adaptação.....	43
FIGURA 5.3	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para a terceira batelada de adaptação.....	44
FIGURA 5.4	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para a quarta batelada de adaptação.....	44
FIGURA 5.5	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para a primeira batelada de adaptação.....	45
FIGURA 5.6	Perfis de decaimento de substrato ( $S_b$ médio expresso em DQO filtrada) para as cinco bateladas de adaptação do lodo.....	45
FIGURA 5.7	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,023 cm/s (•) e expressão (5.1) ajustada (—). - r1.....	48
FIGURA 5.8	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,023 cm/s (•) e expressão (5.2) ajustada (—) - r2.....	48

FIGURA 5.9	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot.]) em função do tempo para $v_s$ de 0,023 cm/s (●) e expressão (5.3) ajustada (—) - r1.....	49
FIGURA 5.10	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot.]) em função do tempo para $v_s$ de 0,023 cm/s (●) e expressão (5.4) ajustada (—) - r2.....	49
FIGURA 5.11	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,045 cm/s (●) e expressão (5.5) ajustada (—) - r1.....	50
FIGURA 5.12	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,045 cm/s (●) e expressão (5.6) ajustada (—) - r2.....	50
FIGURA 5.13	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,045 cm/s (●) e expressão (5.7) ajustada (—) - r1.....	51
FIGURA 5.14	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,045 cm/s (●) e expressão (5.8) ajustada (—) - r2.....	51
FIGURA 5.15	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,058 cm/s (●) e expressão (5.9) ajustada (—) - r1.....	52
FIGURA 5.16	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,058 cm/s (●) e expressão (5.10) ajustada (—) - r2.....	52
FIGURA 5.17	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,058 cm/s (●) e expressão (5.11) ajustada (—) - r1.....	53
FIGURA 5.18	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,058 cm/s (●) e expressão (5.12) ajustada (—) - r2.....	53
FIGURA 5.19	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,067 cm/s (●) e expressão (5.13) ajustada (—) - r1.....	54

FIGURA 5.20	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,067cm/s (●) e expressão (5.14) ajustada (—) – r2.....	54
FIGURA 5.21	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,067 cm/s (●) e expressão (5.15) ajustada (—) – r1.....	55
FIGURA 5.22	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,023 cm/s (●) e expressão (5.16) ajustada (—) – r2.....	55
FIGURA 5.23	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,089 cm/s (●) e expressão (5.17) ajustada (—) – r1.....	56
FIGURA 5.24	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,089cm/s (●) e expressão (5.18) ajustada (—) – r2.....	56
FIGURA 5.25	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,089 cm/s (●) e expressão (5.19) ajustada (—) – r1.....	57
FIGURA 5.26	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,089 cm/s (●) e expressão (5.20) ajustada (—) – r2.....	57
FIGURA 5.27	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,11cm/s (●) e expressão (5.21) ajustada (—) – r1.....	58
FIGURA 5.28	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,11cm/s (●) e expressão (5.22) ajustada (—) – r2.....	58
FIGURA 5.29	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para $v_s$ de 0,11cm/s (●) e expressão (5.23) ajustada (—) – r3.....	59
FIGURA 5.30	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,11cm/s (●) e expressão (5.24) ajustada (—) – r1.....	59

FIGURA 5.31	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,11cm/s (•) e expressão (5.25) ajustada (—) – $r_2$ .....	60
FIGURA 5.32	Perfil (experimental) de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em [Prot]) em função do tempo para $v_s$ de 0,11cm/s (•) e expressão (5.26) ajustada (—) – $r_2$ .....	60
FIGURA 5.33	Valores de $R_{obs t=0}$ de consumo de substrato ( $S_b$ expresso em DQO) em função do aumento dos valores $v_s$ aplicados ao RHALFd ao longo do experimento.....	62
FIGURA 5.34	Valores de $R_{obs t=0}$ de consumo de substrato ( $S_b$ expresso em quantidade total de proteína) em função do aumento dos valores $v_s$ aplicados ao RHALFd ao longo do experimento (•) e expressão (5.27) ajustada (—).....	63
FIGURA 5.35	Valores de carga orgânica aplicada ao RHALFd ao longo do experimento em função dos valores de $R_{obs t=0}$ de consumo de substrato ( $S_b$ expresso em quantidade total de proteína) (•) e expressão (5.28) ajustada (—).....	65
FIGURA 5.36	Perfis de decréscimo de $r_{obs}$ gerados pela expressão de Monod em função do inverso do número de Biot.....	74
FIGURA 5.37	Valores de alcalinidade ao longo do tempo para lodo proteolítico cultivado em RHALFd.....	77
FIGURA 5.38	Valores do teor de Nitrogênio amoniacal ao longo do tempo para lodo proteolítico cultivado em RHALFd.....	77
FIGURA 5.39	Perfil experimental de concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em concentração de proteínas) em função do tempo para $v_s$ de 0,043 cm/s (•) e expressão (5.29) ajustada (—).....	79
FIGURA 5.40	Correlação de $r_{obs}$ e $S_b$ (•) e expressão ajustada (—).....	80
FIGURA 5.41	Morfologias presentes no RHALFd durante o ensaio explorativo.....	82
FIGURA 5.42	Morfologias presentes no lodo proveniente do tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário.....	84

FIGURA 5.43	Padrões de imobilização microbiana no biofilme proteolítico monitorado.....	86
FIGURA 5.44	Evolução quantitativa do biofilme.....	87
FIGURA 5.45	Evolução figurativa da coloração das matrizes colonizadas até o 11° .....	88
FIGURA 5.46	Demanda de alimentação dos quatro RHALFd ao longo dos 22 dias.....	89
FIGURA 5.47	Morfologias presentes no 6° dia de operação do RHALFd.....	90
FIGURA 5.48	Morfologias presentes no 11° dia de operação do RHALFd.....	93
FIGURA 5.49	Morfologias presentes no 16° dia de operação do RHALFd.....	95
FIGURA 5.50	Morfologias presentes no 11° dia de operação do RHALFd.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Aminoácidos com suas abreviaturas e respectivos pesos moleculares.....	6
Tabela 3.2.: composição centesimal da gelatina (Merck Index).....	7
Tabela 4.1: Composição de sais e metais presentes no substrato sintético utilizado no experimento.....	32
Tabela 5.1 Concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em DQO) em função do tempo para diferentes velocidades experimentais ( $v_s$ ) aplicadas no RHALFd. ao longo do experimento .....	46
Tabela 5.2 Concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$ expresso em concentração total de proteínas – mg SAB/L) em função do tempo para diferentes velocidades experimentais ( $v_s$ ) aplicadas no RHALFd. ao longo do experimento .....	47
Tabela 5.3. Valores de velocidades iniciais ( $R_{obs t=0}$ ) de consumo de substrato expresso em DQO (mg / L) para as diferentes velocidades superficiais aplicadas ao RHALFd.....	61
Tabela 5.4. Valores de $R_{obs t=0}$ de consumo de substrato expresso em Quantidade total de proteínas (mg S.A.B. / L) para as diferentes velocidades superficiais aplicadas ao RHALFd.....	61
Tabela 5.5 Velocidades iniciais específicas de consumo de substrato para $S_b$ expresso em quantidade total de proteínas ( $r_{obs t=0}$ ) em função das $v_s$ aplicadas ao longo do experimento no sistema com um volume líquido 0,5 L.....	66
Tabela 5.6 valores de $R_{obs}$ e $r_{obs}$ em função da concentração $S_b$ para a $v_s$ de 0,023 cm / s.....	66
Tabela 5.7 valores de $R_{obs}$ e $r_{obs}$ em função da concentração $S_b$ para a $v_s$ de 0,045 cm / s.....	67
Tabela 5.8 valores de $R_{obs}$ e $r_{obs}$ em função da concentração $S_b$ para a $v_s$ de 0,067 cm / s.....	67
Tabela 5.9 valores de $R_{obs}$ e $r_{obs}$ em função da concentração $S_b$ para a $v_s$ de 0,089 cm / s.....	67

Tabela 5.10 Parâmetros cinéticos aparentes da expressão cinética tipo Monod em função de $v_s$ e coeficientes de correlação para o ajuste não linear da equação de Monod.....	68
Tabela 5.11 Parâmetros cinéticos aparentes da expressão cinética tipo Monod em função de $v_s$ e coeficientes de correlação para a linearização de Line-Weavers Burk.....	68
Tabela 5.12 Parâmetros cinéticos aparentes da expressão cinética tipo Monod em função de $v_s$ e coeficientes de correlação para a linearização de Hannes-Wolf .....	69
Tabela 5.13. Parâmetro cinético ( $K_1$ ) aparentes de expressão cinética tipo primeira ordem para consumo de substrato em função de $v_s$ , e coeficientes de correlação.....	69
Tabela 5.14 Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{obs}^{teor}$ ) para $v_s =$ de 0,023 cm/s.....	70
Tabela 5.15 Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{obs}^{teor}$ ) para $v_s =$ de 0,045 cm/s.....	71
Tabela 5.16 Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{obs}^{teor}$ ) para $v_s =$ de 0,067 cm/s.....	71
Tabela 5.17 Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{obs}^{teor}$ ) para $v_s =$ de 0,089 cm/s.....	71
Tabela 5.18 Valores de $K_{sa}$ para os diferentes valores de $v_s$ aplicados ao longo do experimento.....	72
Tabela 5.19 Valores de $K_s$ e $B_i$ para os diferentes valores de $v_s$ aplicados ao longo do experimento.....	73
Tabela 5.20: Velocidades específicas de utilização de substrato observadas ( $r_{obs}$ ) em mg S.A.B. / ml de suporte * h estimadas pela expressão cinética de Monod em função de diferentes concentrações de substrato na fase líquida para os diferentes valores dos coeficientes de transferência de massa ( $k_s$ ).....	74

Tabela 5.21: coeficientes das expressões ajustadas de correlação de $r_{\text{obs}}$ e $Bi^1$ e respectivos coeficientes de correlação do ajuste ( $R^2$ ).....	75
Tabela 5.22: Valores do módulo de Thiele observado para cada valor de $r^*_{\text{obs}}$ gerado pela expressão de Monod.....	78

## NOMENCLATURA

a	área interfacial para transferência de massa $[L]^{-1}$
$A_p$	área da partícula considerando a esfera equivalente $[L]^2$
Bi	número de Biot
De	difusividade efetiva $[L]^2 \cdot [T]^{-1}$
$K_1^{app}$	constante cinética aparente de primeira ordem $[T]^{-1}$
$K_s^{app}$	constante de saturação do substrato aparente da expressão de Monod $[M] \cdot [L]^3$
$K_s$	constante de saturação do substrato da expressão de Monod $[M] \cdot [L]^3$
$k_s$	coeficiente de transferência de massa na fase líquida $[L] \cdot [T]^{-1}$
$k_{sa}$	coeficiente volumétrico de transferência de massa na fase líquida $[T]^{-1}$
n	número de biopartículas
Q	vazão de líquido $[L]^3 \cdot [T]^{-1}$
$R^2$	coeficiente de correlação
$r_{máx}$	velocidade máxima específica de utilização de substrato $[M] \cdot [T]^{-1}$
$r_{máx}^{app}$	velocidade máxima específica de utilização de substrato aparente $[M] \cdot [T]^{-1}$
$r_{obs}$	velocidade específica de utilização de substrato observada $[M] \cdot [T]^{-1}$
$R_{obs}$	velocidade de utilização de substrato $[M][L]^3 \cdot [T]^{-1}$
$r_{obs t=0}$	velocidade específica inicial de consumo de substrato $[M] \cdot [T]^{-1}$
$R_{obs t=0}$	velocidade inicial de consumo de substrato $[M][L]^3 \cdot [T]^{-1}$
$R_p$	raio da esfera equivalente $[L]$
S	concentração de substrato $[M] \cdot [L]^{-3}$
Sb	concentração de substrato na fase líquida $[M] \cdot [L]^{-3}$
t	tempo $[T]$
$v_s$	velocidade superficial do líquido $[L] \cdot [T]^{-1}$
$V_L$	volume de líquido $[L]^3$
$V_p$	volume de uma partícula $[L]^3$
X	concentração de biomassa $[M] \cdot [L]^{-3}$

## SÍMBOLOS

$\varepsilon$	porosidade do leito
$\phi$	módulo de Thiele
$\phi_{obs}$	módulo de Thiele observado
$\eta$	fator de efetividade
$\eta_{obs}$	fator de efetividade observado
$\mu_{LL}$	viscosidade do líquido [M].[L] <sup>-1</sup> .[T] <sup>-1</sup>
$\theta_c$	tempo de residência celular [T]
$\theta_h$	tempo de detenção hidráulico [T]
$\rho_L$	densidade do líquido [M].[L] <sup>-3</sup>

## ABREVIATURAS

C.O.	carga orgânica
Fapesp	Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo
HMDS	hexametildesilazane
DQO	demanda química de oxigênio
PROT	proteína
[PROT]	concentração de proteínas
RAHLF	reator anaeróbio horizontal anaeróbio de leito fixo
RHALFd	reator anaeróbio horizontal anaeróbio de leito fixo diferencial
SAB	soro albumina bovina
SSV	sólidos suspensos voláteis

## RESUMO

TOMMASO, G. (1999). *Estrutura, caracterização e cinética de lodo anaeróbio imobilizado em espuma de poliuretano degradando substrato sintético contendo proteína como única fonte de carbono*. São Carlos, 1999. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

O presente trabalho apresenta estudos preliminares da degradação anaeróbia de substrato sintético contendo proteína (gelatina) como única fonte de carbono, em reator de leito fixo. A pesquisa enfatiza a cinética de consumo de substrato pelo processo e o desenvolvimento qualitativo do biofilme anaeróbio proteolítico.

Utilizaram-se, para tanto, reatores horizontais anaeróbios de leito fixo diferenciais (RHALFd), preenchidos com espumas de poliuretano.

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Primeiramente, estimaram-se os parâmetros cinéticos do consumo de substrato para lodo previamente imobilizado. As matrizes eram provenientes de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo de bancada, utilizado previamente para estudos sobre a degradação anaeróbia de substrato sintético simulando esgoto sanitário. Finda essa etapa experimental, realizaram-se análises microscópicas do lodo estudado. Posteriormente, monitorou-se o desenvolvimento do biofilme anaeróbio proteolítico formado a partir de inóculo oriundo da primeira etapa do trabalho, durante 22 dias, através de análises de microscopia óptica e eletrônica de varredura. Após a formação do biofilme, estimaram-se também os parâmetros cinéticos de consumo de substrato deste consórcio microbiano.

Ao final do trabalho, concluiu-se que o biofilme desenvolvido, apresentou maior afinidade ao substrato, quando comparado à biomassa previamente imobilizada. Morfologias semelhantes a microrganismos metanogênicos acetoclásticos foram encontradas com muito maior

frequência na biomassa proveniente do tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário. A quase ausência desses microrganismos no biofilme desenvolvido com fonte carbonácea exclusivamente protéica, indica provavelmente, que o processo acetoclástico não tem grande importância na degradação anaeróbia de proteínas, como usualmente ocorre no tratamento anaeróbio de águas residuárias com fontes variadas de carbono.

Palavras-chave: degradação anaeróbia de proteínas; desenvolvimento de biofilme; cinética.

## ABSTRACT

TOMMASO, G. (1999). *Structure, characterisation and kinetic of immobilised sludge in poliurethane foam matrices, degrading synthetic substrate containing protein as the unique carbon source*. São Carlos, 1999. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A preliminar study on the anaerobic degradation of a synthetic substrate containing protein as the unique carbon source is presented. Emphasis was given on the kinetic of substrate utilisation and the development of the proteolytic biofilm.

The research was carried out using four horizontal-flow differential anaerobic immobilised sludge (HAISd) reactors filled with polyurethane matrices.

The experiments were developed in two phases. First, the kinetic parameters of substrate removal were determined for a microbial consortium taken from a HAIS reactor used for the treatment of synthetic substrate simulating domestic sewage. The microorganisms present in the matrices were observed by microscopy analyses. There after, the development of a proteolytic anaerobic biofilm was observed during 22 days by microscopy analyses (optic and electronic). At the end of this phase, the kinetic parameters of substrate removal were also estimated for the biofilm formed.

The biofilm formed specially for the protein degradation showed higher affinity for the substrate, when compared with the biomass immobilised previously.

Morphologies resembling acetoclastic methanogens microorganisms were almost not found during the development of the proteolytic biofilm development, and were present in the matrices originating from the synthetic substrate simulating domestic sewage treatment. It shows that probably the acetoclastic process might not

be important in the anaerobic degradation of protein as usually happens with other types of wastewaters subjected to anaerobic treatment.

Key words: anaerobic degradation of protein; biofilm development; kinetic.

## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento biológico de despejos é o processo mais utilizado para a minimização dos problemas causados pela incorreta disposição de efluentes em corpos d'água.

Este processo emprega a ação conjunta de microrganismos de diferentes espécies em reatores operados sob determinadas condições, resultando na estabilização da matéria orgânica (VAZOLLER, 1995)

A capacidade microbiana em catabolizar diferentes compostos orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos, extraíndo destes compostos fontes nutricionais e energéticas, possibilita o emprego desses agentes biológicos nos processos de tratamento de despejos (VAZOLLER, 1995).

Os agentes biológicos mais importantes na degradação da matéria orgânica poluente são as bactérias e as archaeas, microrganismos que se desenvolvem nos sistemas de tratamento de águas residuárias mediante condições controladas de operação, bem como do tipo de substrato a elas fornecido (VAZOLLER, 1995).

Dentre os processos biológicos de tratamento de águas residuárias, existem os aeróbios e os anaeróbios, assim divididos de acordo com a presença ou ausência de oxigênio molecular dissolvido no meio.

A biodigestão anaeróbia é um processo biológico natural, em que microrganismos anaeróbios, em consórcio, produzem, entre outros metabólitos, metano e dióxido de carbono a partir da degradação da matéria orgânica em ambientes isentos da presença de oxigênio molecular dissolvido.

Segundo FORESTI (1994), a importância da digestão anaeróbia como processo de tratamento de resíduos orgânicos cresceu de forma extraordinária nas últimas décadas, principalmente por apresentar balanço energético mais favorável que os processos aeróbios convencionais. Dentre as suas principais vantagens, pode-se citar o baixo consumo de energia, por não exigir a introdução forçada de oxigênio no meio como os processos aeróbios; a baixa produção de lodo, estimada

como sendo inferior a 20% daquela apresentada por processos aeróbios convencionais; além da possibilidade de recuperação e utilização do gás metano como combustível.

PARKIN & SPEECE (1983) citam ainda duas outras vantagens sobre os processos aeróbios: a necessidade reduzida de nutrientes, e o elevado grau de estabilização do lodo descartado.

A biodigestão anaeróbia pode ser dividida em quatro estágios a saber: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Segundo FORESTI (1994), é importante que todos os estágios sejam mantidos em equilíbrio dinâmico a fim de que a metanogênese ocorra em sua taxa máxima. A manutenção de tal equilíbrio está relacionada com a natureza da água residuária a ser tratada e com a intensidade com que o destino das moléculas de hidrogênio é afetado. As moléculas de hidrogênio devem ser continuamente removidas do meio para assegurar a acetogênese, não prejudicando dessa maneira a metanogênese, já que 70% do potencial metanogênico relaciona-se com a degradação do acetato. Portanto, a estabilidade do processo de biodigestão anaeróbia depende muito mais de mecanismos reguladores intrínsecos que de controles externos. Esses mecanismos auto-reguladores decorrem das interações entre os diversos grupos de bactérias envolvidos no processo com funções distintas e específicas, capazes de manter o pH e o potencial redox do sistema no sentido de otimizar a metanogênese.

A utilização dos processos anaeróbios vem sendo limitada, muitas vezes, pela crença sobre a fragilidade do processo no que diz respeito à sua exposição à cargas tóxicas e sobrecargas orgânicas (SPEECE, 1983). Porém, ao longo dos anos, estudos realizados por vários pesquisadores apontam que o tempo de detenção celular elevado, possível em sistemas de tratamento anaeróbios, é o principal fator que proporciona elevada recuperação de tais processos, quando submetidos à cargas tóxicas ou sobrecargas orgânicas (FORESTI, 1994, SPEECE, 1996).

Dentre as configurações existentes, os reatores de filme fixo são os que proporcionam as maiores razões  $\theta_c/\theta_h$  (SPEECE, 1983).

O filtro anaeróbio foi reintroduzido no cenário tecnológico por YOUNG & McCARTY em 1969, que basearam-se em trabalhos de COULTER et al (1955). Esta configuração é , até os dias de hoje, muito utilizada para tratamento de águas

residuárias industriais, e foi a primeira a viabilizar a aplicação de cargas orgânicas elevadas (de 10 a 20 Kg.m<sup>-3</sup> . d<sup>-1</sup>), tendo portanto, grande importância histórica ( Van HAANDEL & LETTINGA, 1994)

ZAIAT (1996) desenvolveu o Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), que contém espumas de poliuretano como suporte para a imobilização da biomassa anaeróbia. Trata-se de um reator tubular, cuja configuração proporciona o aumento do volume útil reacional do reator, em consequência da redução do volume destinado à separação do gás gerado.

Embora a tecnologia envolvida nos processos anaeróbios de tratamento de águas residuárias tenha avançado muito nos últimos anos, eficiências comparáveis às de reatores aeróbios (no que diz respeito somente à fração líquida do processo), no entanto, não são encontradas, quando do emprego de tais processos, para o tratamento de esgotos sanitários.

Essa limitação pode estar associada à composição da fração orgânica nos esgotos sanitários. De fato, TORRES (1989), estudando o desempenho de reatores anaeróbios na degradação da matéria orgânica presente em esgotos sanitários, constatou maior dificuldade na remoção da fração protéica presente em tal despejo, do que de outras frações.

Na tentativa de melhor elucidar as deficiências ainda existentes no tratamento anaeróbio de esgotos, decidiu-se realizar estudos preliminares da degradação anaeróbia de proteínas em reator de leito fixo, no que diz respeito à cinética de degradação do substrato fornecido, além da formação e composição do biofilme presente no sistema.

Este estudo faz parte de um projeto temático apoiado pela FAPESP em desenvolvimento no Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) - USP, que visa o aprofundamento no conhecimento de filmes microbianos formados em sistemas de tratamento de águas residuárias. Além disso, a presente pesquisa também contribui para o desenvolvimento de um reator horizontal anaeróbio de leito fixo (RHALF), que vem sendo objeto de estudos de vários pesquisadores do Laboratório de Processos Anaeróbios - SHS - EESC - USP.

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo a realização de estudos preliminares da degradação anaeróbia de proteínas em reator de leito fixo preenchido com espumas de poliuretano. Para tanto, foram estimados os parâmetros cinéticos do processo de degradação da gelatina (velocidade específica intrínseca de consumo de substrato e constante de saturação de substrato da equação de Monod), e analisadas a formação e a caracterização biológica do biofilme proteolítico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. *PROTEÍNAS*

Segundo NORTH (1991) e LEHNINGER (1993), as proteínas, apesar de serem moléculas muito versáteis, são quimicamente muito simples. São polímeros nos quais pequenas moléculas, os L -  $\alpha$  - aminoácidos se encontram unidos por ligações peptídicas, formando longas cadeias.

As proteínas são essenciais em todas as células vivas e estão relacionadas, praticamente, a todas as funções fisiológicas de tais estruturas. Tais compostos são utilizados na regeneração de tecidos, funcionam como catalisadores nas reações químicas ocorrentes nos organismos vivos, envolvendo enzimas e hormônios, atuam transportando íons ou moléculas entre os órgãos do corpo humano, além de serem parte fundamental do sistema imunológico dos seres vivos. Juntamente com os aminoácidos, as proteínas são indispensáveis para o desenvolvimento e reprodução dos seres vivos, desde microrganismos até animais superiores (BOBBIO & BOBBIO, 1992; LEHNINGER, 1993; VOET & VOET, 1995).

As unidades fundamentais da estrutura das proteínas são os L-  $\alpha$  - aminoácidos. Todos esses compostos possuem a mesma estrutura, qual seja, um átomo central de carbono, conectado por ligações covalentes a quatro diferentes átomos ou grupos de átomos: um átomo de hidrogênio (- H), um grupo carboxílico (- COOH), um grupo amina (- NH<sub>2</sub>) e um dos 20 tipos de radicais (- R) que diferem os L -  $\alpha$  - aminoácidos entre si (NORTH, 1991).

Algumas proteínas são constituídas por uma única cadeia polipeptídica, porém existem outras constituídas por duas ou mais cadeias. Estas cadeias polipeptídicas podem

diferir entre si, ou serem idênticas. Nesses casos, a proteína pode ser chamada proteína oligomérica, sendo suas cadeias denominadas protômeros (LEHNINGER, 1993).

Os L -  $\alpha$  - aminoácidos encontrados na natureza estão listados na Tabela 3.1, com seus respectivos pesos moleculares e abreviações.

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviação</b>	<b>peso molecular</b>
<b>Prolina</b>	Pro	176
<b>Histidina</b>	His	145
<b>Triptofano</b>	Trp	195
<b>Tirosina</b>	Tyr	171
<b>Fenilalanina</b>	Phe	168
<b>Selenocisteína</b>	Sec	156
<b>Glutamato</b>	Glu	196
<b>Aspartato</b>	Asp	120
<b>Alanina</b>	Ala	89
<b>Valina</b>	Val	117
<b>Leucina</b>	Leu	131
<b>Isoleucina</b>	Ile	131
<b>Metionina</b>	Met	149
<b>Glicina</b>	Gly	75
<b>Serina</b>	Ser	105
<b>Cisteína</b>	Cys	121
<b>Treonina</b>	Thr	119
<b>Aspargina</b>	Asn	132
<b>Glutamina</b>	Glu	146
<b>Lisina</b>	Lys	146
<b>Arginina</b>	Arg	174

Tabela 3.1. Aminoácidos com suas abreviaturas e respectivos pesos moleculares. Fonte: SAYED, 1987 e MADINGAN, 1997.

Nas células, as proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes. Todas estas moléculas contém carbono (45 - 55%) hidrogênio (6 - 8%), oxigênio (19 - 25%), nitrogênio (14 - 21%) e, salvo raras exceções, enxofre (0 - 4%) (SAYED, 1987).

### 3.1.1. GELATINA

A gelatina é obtida através da hidrólise controlada do colágeno, uma proteína fibrosa insolúvel em água, presente nos ossos, tendões e ligamentos dos animais superiores, sendo responsável pela resistência de tais estruturas (BOBBIO & BOBBIO, 1992; VOET & VOET, 1995).

Sendo uma proteína, a gelatina é composta por uma seqüência de aminoácidos, com elevados conteúdos de glicina, prolina e hidroxiprolina

As moléculas de gelatina são muito grandes com peso variando na faixa de ordem de grandeza  $10^3$  a  $10^5$  Daltons . A variação do peso molecular da gelatina interfere em suas propriedades físicas, afetando particularmente sua viscosidade e consistência do gel por ela formado.

Estruturalmente, a molécula de gelatina contém repetidas seqüências formadas por moléculas de glicina, ligadas às moléculas de prolina e hidroxiprolina. Esta seqüência é responsável pela estrutura de tripla hélice presente na molécula de gelatina e também por sua habilidade de formar gel, quando as regiões helicoidais da cadeia protéica imobilizam água.

SCHIAVUZZO (1997), estudando a degradação anaeróbia de gelatina em reatores anaeróbios de mistura completa, incubados à temperatura de 37° C, concluiu que o processo ocorre lentamente no período de partida dos reatores, porém, após o período de adaptação, a degradação é rápida, sendo que, do ponto de vista cinético, a degradação anaeróbia da gelatina se processa de acordo com uma reação de primeira ordem.

Na tabela 3.2. encontra-se a composição centesimal da gelatina.

<b>Aminoácido</b>	<b>Porcentagem na molécula %</b>
Glicina	25,5
Alanina	8,7
Valina	2,5
Leucina	3,2
Isoleucina	1,4
Metionina	1
Cisteína	0,1
Fenilalanina	2,2
Hidroxiprolina	14
Prolina	18
Serina	0,4
Treonina	1,9
Tirosina	0,5
Aspartato	6,6
Glutamato	11,4
Arginina	8,1
Lisina	4,1
Histidina	0,8

Tabela 3.2.: Composição centesimal da gelatina (Merck Index, 1995)

### 3.1.2. ESTRUTURA PROTÉICA

As funções das proteínas só podem ser compreendidas em termos de sua estrutura, ou seja, das relações tridimensionais existentes entre os átomos componentes de uma proteína (VOET & VOET, 1995).

De acordo com BOBBIO & BOBBIO(1992), embora as proteínas variem muito em massa molecular e forma, a maioria desses compostos tem massa molecular de mesma ordem de grandeza e suas formas não se desviam muito da forma de uma esfera ou de um elipsóide, sendo que, para que uma molécula de proteína adquira e mantenha essas formas, são necessárias várias e complexas interligações. Quatro tipos de estrutura devem ser considerados para a definição das proteínas:

### ✓ *ESTRUTURA PRIMÁRIA*

A estrutura primária de uma proteína refere-se apenas à seqüência dos aminoácidos presentes em suas cadeias peptídicas, sem levar em consideração outros tipos de ligações como interações causadas por forças de Wan der Vaals, ou pontes de hidrogênio. Nessas cadeias, o aminoácido correspondente ao terminal nitrogenado, isto é, o aminoácido que contém um grupo amínico ou imínico livre, é denominado N - aminoácido, e o aminoácido correspondente ao terminal com o grupo carboxila livre é denominado C - aminoácido. A estrutura primária é a única que pode ser determinada por meio de reações químicas, mas as dificuldades apresentadas por tais reações, fizeram com que, até hoje, apenas algumas proteínas tivessem suas estruturas primárias completamente elucidadas. Da seqüência de aminoácidos, que é única para cada proteína, dependem outras estruturas. Os aminoácidos que compõem a cadeia peptídica podem ser facilmente identificados pela hidrólise total da proteína e separação dos produtos resultantes, o que, no entanto, não dá nenhum indício da posição que tais compostos ocupam na cadeia.

### ✓ *ESTRUTURA SECUNDÁRIA*

A estrutura secundária de uma proteína refere-se à maneira que as cadeias peptídicas estão arranjadas no espaço. Resultados de análises por difração de raios X mostram que as cadeias peptídicas não são esticadas, mas torcidas, dobradas, ou enroladas sobre si mesmas, podendo, então, adquirir várias conformações. Entre essas conformações, as de menor energia livre e, portanto, as mais estáveis, são aquelas nas quais todos os grupos -NH das ligações peptídicas estão unidos ao grupos -C=O por pontes de hidrogênio, o que leva à formação de duas organizações para as quais Pauling propôs as seguintes estruturas: uma, semelhante a uma folha de papel pregueada, estabilizada por ligações de hidrogênio intramoleculares; outra, com organização  $\alpha$  - hélice, na qual as cadeias peptídicas formam hélices contendo, em cada volta, de três a cinco unidades de aminoácidos, sendo estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares. Outros grupos, além dos presentes nas ligações peptídicas, podem participar das ligações de hidrogênio, como os grupos hidroxílicos, amínicos e imínicos das cadeias laterais dos aminoácidos.

### ✓ *ESTRUTURA TERCIÁRIA*

A estrutura terciária refere-se a posteriores dobras e enrolamentos que as cadeias peptídicas sofrem, resultando em uma estrutura complexa e mais compacta para as proteínas. A estabilização dessa estrutura é atribuída a ligações covalentes, como por exemplo, pontes bissulfeto em proteínas contendo aminoácidos ricos em enxofre, e mesmo a ligações eletrovalentes causadas pela atração que exercem entre si, cadeias laterais carregadas positiva e negativamente. Nem sempre existem condições para determinar se uma dada ligação ou dobra pertence à estrutura terciária ou secundária de uma proteína, sendo que as duas estruturas dizem respeito à conformação da proteína.

### ✓ *ESTRUTURA QUATERNÁRIA*

A estrutura quaternária define as associações existentes por duas ou mais cadeias peptídicas na formação de uma única proteína. Nessa associação, estão provavelmente envolvidas as mesmas ligações presentes nas estruturas secundária e terciária, com exceção das ligações covalentes.

### **3.1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

Dependendo de sua conformação, as proteínas podem ser classificadas em três classes:

#### ✓ *PROTEÍNAS FIBROSAS*

São fisicamente resistentes, insolúveis em água ou soluções de sais diluídos e dificilmente sujeitas a ação de enzimas proteolíticas. Exemplos de tais estruturas são o colágeno, a  $\alpha$ -elastina e a  $\alpha$ -queratina (SAYED, 1987).

#### ✓ *PROTEÍNAS GLOBULARES*

São solúveis em sistemas aquosos. A maioria das proteínas dessa classe são sujeitas a quebra de sua estrutura devido à ação de enzimas proteolíticas, originando aminoácidos. Proteínas como a albumina, globulina, histonas e prolaminas são incluídas nessa classe (SAYED, 1987).

### ✓ *PROTEÍNAS CONJUGADAS*

São proteínas combinadas com substâncias não protéicas como lipídeos, ácidos nucleicos, carboidratos entre outras. Estas substâncias são chamadas grupos prostéticos. Algumas proteínas contém mais de um grupo prostético, e usualmente este grupo representa um papel muito importante na função biológica dessas moléculas. Estas proteínas são então, classificadas em termos de suas substâncias combinadas. De acordo com a presença de tais substâncias, suas propriedades como solubilidade e suscetibilidade à quebra, por ação enzimática, são variáveis. Dentre essas proteínas, destacam-se as fosfoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, cromoproteínas, glicoproteínas, metaaloproteínas e a miosina (SAYED, 1987; LEHNINGER, 1993).

### **3.2. DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE PROTEÍNAS**

A degradação anaeróbia de proteínas é importante na natureza para a reciclagem de nitrogênio e carbono. Águas residuárias contendo elevado teor protéico têm sido freqüentemente tratadas em reatores anaeróbios (SAYED, 1987).

Segundo McINERNEY (1988), nos biodigestores anaeróbios, assim como no trato intestinal de animais, os microrganismos responsáveis pela degradação protéica são um grupo especializado que realiza tal tarefa em busca de energia. Para tanto, as proteínas são hidrolisadas a peptídeos e aminoácidos, sendo estes últimos rapidamente fermentados, dando origem a produtos como ácidos voláteis, amônia e dióxido de carbono.

#### **3.2.1 HIDRÓLISE PROTÉICA**

Na digestão anaeróbia, as proteínas biodegradáveis são hidrolisadas por bactérias hidrolíticas fermentativas. Dois grupos de enzimas microbianas são necessários para a hidrólise proteolítica, as proteases, que hidrolizam a molécula à peptídeos, e as peptidases, que quebram os peptídios em aminoácidos (SCHELEGEL, apud SAYED, 1987). Os aminoácidos, então, podem penetrar a parede celular e transformam-se em proteína microbiana, pela via anabólica, e ácidos orgânicos e amônia, pela via catabólica. Este processo se encontra ilustrado na Figura 3.1.

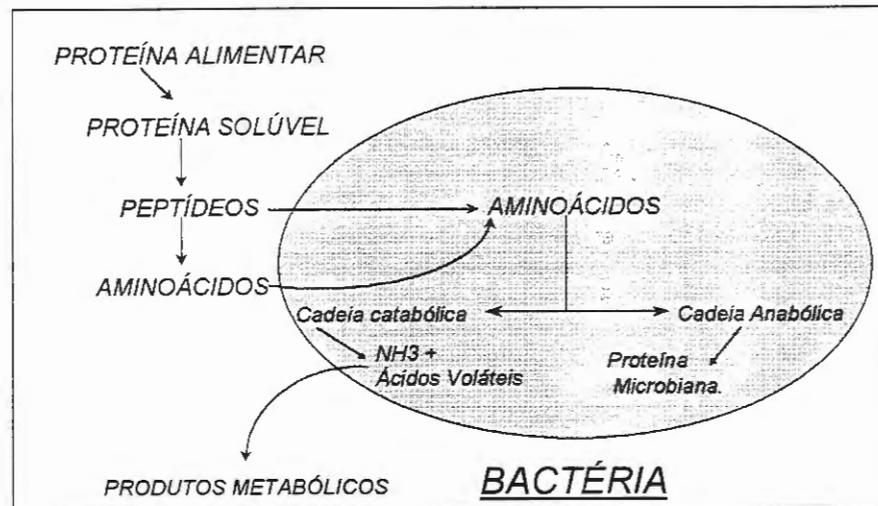


Figura 3.1: Hidrólise proteica, adaptado de SCHIAVUZZO, (1997)

A ação das enzimas proteolíticas é evidenciada pela determinação da atividade de tais compostos em digestores anaeróbios. Tais compostos, após serem liberados pelas bactérias, permanecem presentes no meio.

Segundo SAYED (1987), os fatores que afetam a hidrólise enzimática das proteínas são a especificidade enzimática, a conformação das proteínas, a concentração de substrato e de enzimas, o pH e a temperatura ambiente, além da presença de substâncias inibitórias e o tempo de contato.

#### ✓ ESPECIFICIDADE ENZIMÁTICA

Não é possível para uma única enzima realizar, separadamente, a hidrólise completa de uma proteína. Normalmente, grupos de enzimas atuam de maneira combinada e estreitamente controlada na realização de tal tarefa.

#### ✓ CONFORMAÇÃO PROTÉICA

Proteínas globulares e conjugadas são mais susceptíveis à hidrólise, quando comparadas às proteínas fibrosas.

#### ✓ CONCENTRAÇÃO ENZIMA / SUBSTRATO

Como qualquer outra reação bioquímica, regulada por ação enzimática, a hidrólise proteica depende da concentração de substrato em relação à concentração de enzimas presentes no meio.

✓ *pH*

Os valores ótimos de pH para a hidrólise protéica situam-se na faixa de 4,5 - 8,5.

✓ *TEMPERATURA*

Deve ser preferivelmente superior a 30° C.

✓ *SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS*

Devem estar ausentes.

✓ *TEMPO*

Deve ser fornecido o tempo de contato necessário para a ocorrência da reação.

A solubilidade das proteínas vem sendo citada como fator limitante na hidrólise protéica no rúmen , pelo fato de proteínas mais solúveis serem mais facilmente hidrolisadas, o que porém, nem sempre ocorre. Algumas vezes, proteínas menos solúveis são hidrolisadas mais facilmente, como é o caso da ovoalbumina e albumina em relação à caseína (mais solúvel) (McINERNEY, 1988).

A estrutura terciária e a presença de pontes bissulfeto parecem ser os fatores mais importantes na hidrólise protéica, no que diz respeito à molécula em si. Essa hipótese é sugerida pelo fato de o tratamento das proteínas com Dithiothreitol (composto destruidor de pontes bissulfeto) aumentar a taxa de degradação de tais moléculas no rúmen dos mamíferos (McINERNEY, 1988).

É importante citar que segundo HESPELL apud McINERNEY,(1988), entre outros a degradação de proteínas em reatores, assim como em outros ambientes anaeróbios é provavelmente muito similar àquela encontrada no rúmen.

### **3.2.2.. FERMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS**

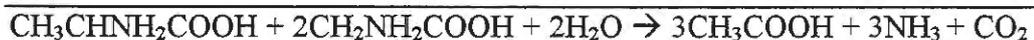
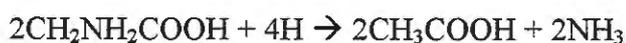
De acordo com McINERNEY (1988), após a etapa de hidrólise, os aminoácidos são rapidamente fermentados, originando ácidos voláteis de cadeia curta, nitrogênio amoniacal e dióxido de carbono, por bactérias acidogênicas fermentativas, em busca de energia.

A degradação anaeróbia de aminoácidos envolve reações de oxi-redução entre um ou mais aminoácidos, ou mesmo entre tais compostos e moléculas não nitrogenadas derivadas dos aminoácidos. As reações de oxidação são similares, se não idênticas, às que ocorrem com as bactérias aeróbias, porém, obviamente, reações envolvendo oxidantes tão poderosos quanto o oxigênio, não são encontradas em ambientes anaeróbios. Desaminações, transaminações e  $\alpha$  - ceto oxidações, são as reações de oxidação encontradas na fermentação de aminoácidos (McINERNEY, 1988).

As reações redutivas encontradas na fermentação anaeróbia de aminoácidos são muito distintas das encontradas em ambientes aeróbios. Os aceptores de elétrons mais encontrados são: aminoácidos,  $\alpha$  e  $\beta$ -cetoácidos e suas coenzimas A (derivadas), além de outros prótons. Os produtos originados mais freqüentemente são ácidos orgânicos de cadeias curtas, ácido succínico, ácido  $\delta$  - aminovalérico e hidrogênio (SAYED, 1987).

Um único aminoácido resultante da hidrólise protéica é degradado especificamente e pode originar vários ácidos voláteis, como é o caso da fermentação da alanina que, além de resultar em nitrogênio amoniacal e dióxido de carbono, origina ácido acético e butírico (SAYED, 1987).

Muitos organismos podem obter energia por meio de reações de oxi-redução envolvendo pares de aminoácidos. Estas são as chamadas reações de Stickland, onde um membro do par é oxidado enquanto o outro é reduzido. A alanina, quando oxidada pela presença da glicina, é um bom exemplo de reações de Stickland, sendo que, nesse caso, o único ácido originado é o acético (McINERNEY, 1988):



Nas reações de Stickland, alguns aceptores de elétrons são a glicina, prolina, hidroxiprolina, ornitina, arginina e triptofano. Nem todos esses aminoácidos são utilizados por todas as espécies de bactérias envolvidas e as taxas de utilização são diferentes em função da espécie bacteriana e dos substratos envolvidos. Alguns doadores de elétrons são a alanina, leucina, isoleucina, valina e histidina, sendo que

todos, com exceção da histidina, são oxidados por  $\alpha$ -cetoácidos (McINERNEY, 1988).

### 3.2.3. BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS

As bactérias proteolíticas constituem o grupo especializado de microrganismos responsáveis pela degradação de proteínas. Os digestores anaeróbios de lodo contêm um grande número de bactérias proteolíticas (aproximadamente  $6,5 \times 10^7$  / ml), sendo as do gênero *Clostridium* (gram positivas) as mais encontradas (McINERNEY, 1988).

O gênero *Clostridium* é constituído por bacilos, usualmente Gram + em estágios iniciais da vida (com algumas exceções), móveis ou não. Normalmente, as espécies são quimiorganotróficas, algumas quimioautotróficas ou quimiolitotróficas. Quando metabolizam aminoácidos, produzem misturas de ácidos orgânicos e álcoois. A maioria das espécies é anaeróbia obrigatória e seu crescimento mais rápido se dá em valores de temperatura entre 30 e 37 °C e pH variando de 6,5 a 7,0 (CATO et al., 1984)

Devido à sua conhecida ação proteolítica, MEAD apud McINERNEY (1988) dividiu o gênero *Clostridium* em quatro grupos, de acordo com os aminoácidos utilizados e os produtos derivados da fermentação.

#### ✓ GRUPO I:

São microrganismos que realizam a reação de Stickland entre pares de aminoácidos. Essas bactérias reduzem prolina ou arginina a  $\delta$ -aminovalerato, pela oxidação da serina, entre outros.

#### ✓ GRUPO II:

Microrganismos fermentadores da arginina e/ou glicina, não produzindo  $\delta$ -aminovalerato.

#### ✓ GRUPO III:

Bactérias fermentadoras de glutamato, utilizando serina e histidina.

#### ✓ GRUPO IV:

*Clostridium putrefaciens*, bactéria utilizadora de serina e thereonina

As bactérias dos grupos II, III, IV, além de não produzirem  $\delta$ -aminovalerato, também não realizam produção de  $\alpha$  e  $\gamma$ -aminobutirato.

Segundo dados obtidos por SIEBERT & TORIEN (1969), após incubação de 7 dias de material proveniente de lodo de tratamento de esgotos domésticos, a maior parte das bactérias presentes nesses ambientes eram proteolíticas. Dentre elas, as espécies mais encontradas foram do gênero *Clostridium*. O segundo maior grupo de bactérias proteolíticas isolado foi constituído por *Peptococcus anaerobios*, sendo contudo, citado pelos autores como fracamente proteolíticos. Das 43 culturas puras obtidas nesse estudo, somente duas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Eubacterium*, o que levou à conclusão de que tais microrganismos não são muito importantes no processo de digestão estudado. Todavia, segundo WILLIAMS apud McINERNEY (1988), espécies *Eubacterium*, juntamente com *Clostridium sp.*, são os microrganismos proteoliticamente ativos em digestores para estabilização de soro de leite.

MADINGAN et al. (1997) também citaram as bactérias pertencentes ao gênero *Eubacterium*, como espécies importantes na degradação anaeróbia de proteínas. Estes microrganismos são anaeróbios obrigatórios e produzem uma mistura de ácidos orgânicos, que inclui o ácido butírico, o acético, o fórmico e o láctico, a partir do metabolismo de composto como os aminoácidos.

Segundo BLACKBURN et al., apud McINERNEY (1988), outras bactérias com possibilidade de participação do processo de degradação anaeróbia de proteínas são pertencentes aos gêneros *Staphilococcus*, *Streptococcus* e *Bacterioides*, sendo que, de acordo com SCHELEIFER. (1986), pelo menos nove espécies desse último gênero degradam gelatina .

As espécies pertencentes ao gênero *Staphilococcus*, são células esféricas, gram positivas, não móveis, com pigmentos carotenóides presentes na maioria de suas culturas. Possuem metabolismo respiratório ou fermentativo, sendo que algumas espécies podem se comportar das duas maneiras. Os requerimentos nutricionais são variáveis, porém, a maioria das espécies identificadas requer uma fonte orgânica de nitrogênio (como aminoácidos) para seu crescimento. O restante das espécies conseguem crescer na presença de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , como única fonte de nitrogênio. Uracila e/ou uma fonte fermentável de carbono (como piruvato) podem ser

necessárias para algumas espécies que crescem na ausência de oxigênio. Várias espécies são isoladas a partir de uma grande quantidade de produtos animais (carnes, leites e queijos). A produção de protease e a hidrólise de gelatina são realizadas por muitas das espécies pertencentes a esse gênero, sendo que várias espécies produzem amônia a partir da arginina (SCHLEIFER et al, 1984).

*Streptococcus sp* são bactérias normalmente esféricas ou ovóides, que ocorrem em pares ou cadeias, Gram positivas e anaeróbias facultativas. Seu metabolismo é fermentativo e algumas espécies metabolizam arginina e serina, aminoácidos presentes na composição de gelatina. Os requerimentos nutricionais de tais microrganismos são complexos e variáveis (SCHLEIFER, 1984).

NAGASE e MATSUO (1982) estudaram a degradação anaeróbia de aminoácidos e algumas proteínas, dentre as quais a gelatina, na digestão anaeróbia, em termos de interações entre organismos fermentativos e metanogênicos. Neste estudo, alguns aminoácidos (valina e leucina) foram degradados oxidativamente por desidrogenação, com organismos metanogênicos atuando como aceptores de hidrogênio. Neste caso a inibição da metanogênese por adição de clorofórmio inibiu a degradação dos aminoácidos e/ou causou variações na composição dos ácidos voláteis excretados pelos microrganismos fermentativos. A presença de glicina diminuiu o efeito da inibição por adição de clorofórmio, provavelmente porque esta molécula agiu comoceptor de hidrogênio no lugar dos organismos metanogênicos. Este fato sugeriu que reações de oxidação e redução acopladas entre dois aminoácidos, um atuando como doador e outro comoceptor de hidrogênio, podem ocorrer tanto na degradação de proteínas quanto na degradação de uma mistura de aminoácidos. A produção de ácidos voláteis a partir da degradação da alanina quase não foi afetada quantitativamente com a inibição da metanogênese, todavia houve modificação na composição dos ácidos excretados por organismos fermentativos, que em lugar de produzirem somente ácido acético, foi detectada também a presença de ácido propiônico. Em relação à degradação de algumas proteínas (caseína albumina e gelatina), foi observado que o processo não foi afetado quando a metanogênese foi inibida. Este fato sugeriu que os aminoácidos que fazem parte das citadas proteínas podem ser degradados pelas reações de oxidação e redução acopladas. Os autores concluem com isso, que a degradação de tais proteínas pode

não ser dependente da ação dos organismos metanogênicos como aceptores de hidrogênio.

STAMS (1994) cita que o passo inicial da degradação de alguns aminoácidos ( alanina, valina, leucina e isoleucina) é uma desaminação NAD(P) – dependente resultando em seus keto - ácido correspondentes. A energia livre de Gibbs nas condições padrão desta reação quando acoplada com a formação de hidrogênio ou formiato é em torno de 60 kJ / mol, sendo dessa maneira necessária a presença de organismos metanogênicos para impulsionar a reação, consumindo os produtos por ela formados. O autor ainda comenta ser este o passo mais difícil energeticamente no catabolismo microbiano de tais compostos, e que a produção dos diversos metabólicos, tanto quantitativamente como qualitativamente, é função da pressão parcial de nitrogênio no meio.

McINERNEY (1988), afirma que estudos sugerem que a transferência de moléculas de hidrogênio inter-espécies é importante na degradação de certos aminoácidos. Por exemplo, as reações de desaminação ou descarboxilação oxidativas com produção de hidrogênio a partir de aminoácidos reduzidos como a alanina e a lucina são energeticamente desfavoráveis em condições padrão. Dessa forma, a produção de hidrogênio a partir destes compostos só ocorrerá se a pressão de hidrogênio for mantida baixa por espécies utilizadoras de tais moléculas. Todavia, a produção de hidrogênio por aminoácidos mais oxidados como o glutamato, é favorável em condições padrão, e portanto a degradação destes compostos pode não depender da transferência inter-espécies de hidrogênio.

### **3.3. SISTEMAS DE BIOMASSA FIXA**

Segundo CAMPOS (1992), uma das maiores contribuições à evolução dos processos biológicos para tratamento de águas residuárias é devida ao aprendizado crescente de técnicas de imobilização e retenção de bactérias, quer na forma de grânulos, flocos ou agregados, quer na forma de biofilme aderido a suportes inertes.

Os sistemas que utilizam a imobilização e a retenção de bactérias fundamentam-se no princípio da imposição de tempo médio de retenção celular no interior do reator suficientemente grande (obtendo-se, dessa maneira, a maior

concentração admissível de microrganismos), para que se possa explorar o máximo possível de sua potencialidade natural (CAMPOS, 1992).

Dentre os sistemas que exploram a imobilização e retenção de microrganismos ativos em processos de tratamento de despejos, destacam-se os sistemas de biomassa fixa na forma de biofilmes. Segundo HAMILTON apud CAMPOS (1994), o termo biofilme é utilizado para definir a agregação discreta de microrganismos e seus produtos metabólicos, aderidos a uma determinada interface.

SPEECE (1996) afirmou que a elevada capacidade de retenção de sólidos apresentada pelos sistemas de biomassa fixa contribui para a ~~do~~ não ocorrência do arraste de células dos reatores, além de ser particularmente favorável à aclimação dos microrganismos expostos a toxicidade crônica.

### 3.3.1. MATERIAIS SUPORTE

Existem inúmeras alternativas para a escolha de materiais suporte para biofilmes. A capacidade de aderência de tais suportes tem um papel muito importante no início da colonização microbiana, sendo que, passada esta primeira fase, tal característica tem sua importância diminuída (CAMPOS, 1994).

VERRIER e colaboradores (1987 e 1988) estudaram a fase inicial de adesão de quatro culturas puras metanogênicas, concluindo que superfícies hidrofóbicas proporcionam adesão microbiana mais rápida a meios suporte não porosos. No entanto, não foram todas as culturas que responderam da mesma forma em relação à adesão aos meios suportes testados, podendo-se concluir que o mecanismo de adesão é influenciado, tanto pelas características do suporte, quanto pelas características das células em questão.

Em relação à hidrofobicidade, preferencialmente, as bactérias tendem a aderir a superfícies com característica semelhante à da sua parede celular, sendo que as superfícies mais hidrofóbicas apresentam taxas mais elevadas de aderência microbiana. Dentre todas as espécies testadas, *Methanotherix soehngeni* foi o microrganismo cuja adesão foi mais rápida e deu-se em polímeros hidrofóbicos, fato este que também pode ser explicado em termos das cargas elétricas presentes na parede celular. Já a espécie *Methanosarcina mazei*, mostrou-se como um microrganismo cuja adesão inicial foi fraca em biofilmes de reatores de leito fixo

ruim em termos de adesão inicial de biofilmes de reatores de leito fixo. A presença de poros e rugosidade na superfície do material, por proporcionar um micro ambiente protegido para os microrganismos, favorece a formação inicial do biofilme (VERRIER, 1987).

A rugosidade do material suporte interfere positivamente na aderência microbiana em reatores de fluxo descendente sendo que, no caso de fluxo ascendentes, o tamanho e a morfologia do material suporte são as características mais importantes (COPP & KENNEDY apud VERRIER, 1988).

Dentre os vários meios suporte passíveis de utilização nos processos anaeróbios de tratamento de águas residuárias, os poliuretanos formam um grupo de material plástico cujas propriedades mostram características muito interessantes, destacadas a seguir, segundo PASIC (1990):

✓ propriedades (densidade, tamanho de partícula e velocidade de sedimentação) passíveis de variações; realizadas facilmente em seu processo produtivo;

✓ elevada porosidade interna;

✓ grande estabilidade à hidrólise;

✓ não biodegradabilidade.

FYNN & WHITMORE (1984) testaram quatro tipos de espumas de poliuretano (densidade de  $0,03 \text{ g/ cm}^3$ ), as quais diferiam apenas no tocante ao tamanho dos poros (20, 30, 45 e 60 poros por polegada linear - PPI). Os reatores eram do tipo mistura completa e foram alimentados com formiato de sódio como fonte única de carbono, o que pode ter contribuído para algum tipo de seleção populacional. Em relação à adesão de microrganismos metanogênicos, os autores concluíram que o poliuretano não apresenta boas características de retenção celular, quando o sistema é exposto a elevadas taxas de carregamento hidráulico. Tal fato foi associado à ausência de polímeros extracelulares. Todavia, os autores ressaltaram que a presença de outros microrganismos necessários ao consórcio anaeróbio (além das bactérias metanogênicas), poderia melhorar as características de adesão microbiana.

GIJZEN et al. (1988) estudaram a degradação anaeróbia de lodo de uma indústria de papel em um digestor de duas fases contendo microrganismos de rumen

e matrizes de poliuretano colonizadas. A colonização das matrizes (densidade de 18 Kg/ m<sup>3</sup> e 20 poros por cm linear) foi acompanhada e se deu de maneira rápida e densa quando o reator era alimentado com uma mistura de ácidos voláteis contendo ácido acético, butírico e propiônico. Após 13 dias foram observadas conversões eficientes de acetato e butirato a metano (80 - 90% e 95 - 100% respectivamente). A degradação do propionato procedeu-se de maneira um pouco mais lenta, sendo que por volta do vigésimo dia após a inoculação, foi observada a degradação estável de tal composto em torno de 80%. Após três semanas de inoculação, a concentração de biomassa nas partículas era de 0,02 +/- 0,003 g de S.V. / cm<sup>3</sup>. Exames sob microscopia eletrônica revelaram a presença de agregados de microrganismos nas cavidades da espuma de poliuretano. Contestando as observações de FYNN & WHITMORE (1984), as bactérias pareciam estar fisicamente associadas ao suporte. Foram encontrados longos filamentos do tipo *Methanothrix sp* e um pequeno número de *Methanosarcina sp*. Quando o reator foi alimentado com o lodo proveniente da indústria de papel, (substrato particulado), constatou-se a diminuição na eficiência do processo (em relação à produção de metano), possivelmente devido ao preenchimento dos poros do suporte pelas partículas presentes no substrato.

CALZADA et al. (1984), estudando o tratamento anaeróbico em duas fases de água residuária do processamento do café, com biomassa fixa em partículas de poliuretano, variaram as taxas de carregamento orgânico de 5 a 26 Kg de S.V./m<sup>3</sup> x dia. Os reatores utilizados eram constituídos por uma coluna com volume de 0,15 L, tendo sido posteriormente ampliado para 12 L. O fluxo nos reatores era ascendente, sendo que produções de metano registradas foram na faixa de 1,8 a 3,42 m<sup>3</sup>/ m<sup>3</sup> de reator x dia, o que representou de 81 à 97 % do total de gás produzido. e?

HUYSMAN et al. (1983) operaram vários reatores anaeróbios com diferentes tipos de meios suporte, porosos e não porosos. Três dos reatores continham poliuretano reticulado (porosidade = 97% e densidade = 30 Kg/ m<sup>3</sup>). O tamanho dos poros das partículas era de 2,21 mm, 0,43 mm e 0,27 mm. Todos os reatores foram alimentados com substratos sintéticos contendo etanol e acetato, entre outros nutrientes. A colonização das partículas de poliuretano foi a mais rápida e densa, quando comparada a materiais não porosos (zeolita, argex, glassbeads e carvão ativado) e outros materiais porosos (esponja natural e poliuretano não reticulado). O

reator que apresentou melhores resultados foi o preenchido por partículas de poliuretano com tamanho dos poros igual a 0,43 mm. A densidade de biomassa encontrada em tal reator foi da ordem de 15 g S.S.V./ L. Foi encontrada uma população metanogênica composta por *Methanosarcina* (90%), *Methanothrix* e *Methanococcus*. Os autores concluíram que a rugosidade da superfície do material utilizado, a porosidade e o tamanho dos poros, são respectivamente, os fatores que mais afetam a velocidade de colonização bacteriana a meios suportes inertes.

VARESCHE et al. <sup>(1980)</sup> estudaram a composição e estrutura do biofilme encontrado em partículas de poliuretano, provenientes de um reator horizontal anaeróbio de leito fixo, alimentado com substrato sintético à base de glicose. Análises realizadas com auxílio de microscopia eletrônica, evidenciaram 3 formas de retenção de biomassa presentes nas partículas de meio suporte: microgrânulos (com tamanho variando de 270 a 470  $\mu\text{m}$ ) no interior da espuma, biofilmes e células individuais aderidos à superfície das partículas de poliuretano. Ao final do estudo, os autores concluíram que as matrizes de poliuretano oferecem excelentes condições para o crescimento e retenção microbiana sob condições anaeróbias por, entre outros fatores, favorecer o fluxo de substrato e produtos metabólicos fermentativos.

### 3.3.2 BIOFILME - INSTALAÇÃO E EVOLUÇÃO

A instalação de um filme biológico, aderindo a um suporte vivo ou inanimado, inicia-se quando a superfície do citado suporte encontra-se limpa e exposta a um ambiente aquoso (BRYERS, 1988). Segundo HAMILTON apud CAMPOS (1994), diversos fatores predominam no início da formação do biofilme, dentre eles, a concentração de nutrientes e a atividade metabólica dos organismos fixos e livres.

Segundo HUYSMAN e colaboradores (1983), é provável que a rugosidade, a porosidade e o tamanho dos poros afetem a velocidade da colonização microbiana ao suporte.

A instalação da primeira camada de bactérias é considerada o fenômeno de maior importância para o desenvolvimento do futuro biofilme (VERRIER, MORTIER e ALBAGNAC, 1987)

O processo de instalação e formação inicial do biofilme pode ser considerado como sendo produto de várias fases (HAMILTON 1987 apud CAMPOS, 1994). Inicialmente, é formado um filme de acondicionamento da superfície. O fenômeno de adsorção de moléculas orgânicas (normalmente proteínas) é o que governa esta fase. Posteriormente, ocorre a adsorção das células à superfície previamente preparada pela etapa anterior. Estas duas primeiras etapas são de curta duração, alguns minutos apenas, e a aderência das células é considerada ainda reversível, sendo que VAN LOOSDRECHT et al. (1989) concluíram não haver contato direto entre a célula e a superfície do meio suporte. A partir de então, as células começam a aderir ao material suporte de maneira irreversível, através de materiais poliméricos extracelulares.

Os polímeros extracelulares produzidos na fase latente de desenvolvimento do biofilme proporcionam aderência irreversível dos microrganismos aos materiais suportes, porém, trabalhos realizados por BRYERS (1988) não evidenciaram se tais polímeros são produzidos antes ou depois do processo de aderência irreversível. Na etapa de aderência irreversível, nota-se o encerramento do movimento browniano e a remoção da camada microbiana formada se dá somente por forças de cisalhamento muito fortes (ARAÚJO, 1995).

EHRLINGER et al. (1987) relacionaram o aumento da produção de polímeros extracelulares com o aumento da população de bactérias acidogênicas no meio, causado pelo fornecimento de glicose a uma população anaeróbia. O fornecimento de proteínas à mesma população não resultou em aumento de produção de polímeros extracelulares. O autor sugere, dessa maneira, que a produção de tais polímeros, independente da fase na qual ocorra, é função também do substrato fornecido.

ARAÚJO (1995) concluiu que a produção de polímeros extracelulares está relacionada com a temperatura de operação do processo e com a composição do substrato no que diz respeito à concentração de nitrogênio e carboidratos.

CAMPOS(1992), operando reator de leito fluidificado, com areia como material suporte, observou que quando eram aplicadas elevadas concentrações de carboidratos, biopartículas previamente formadas (areia + biofilme) aglutinavam-se, produzindo novas partículas muito maiores, com até 1 cm. Nessas biopartículas, observaram-se diversos grãos de areia totalmente envolvidos por biomassa

constituída de polímeros extracelulares e de microrganismos. Aparentemente, essas formações ocorreram quase que essencialmente fundamentadas na elevada produção de polímeros extracelulares, provocada pela presença de carboidratos em grande concentração e pela deficiência de nitrogênio.

Segundo COSTERTON et al. (1986), a adesão dos microrganismos às superfícies inertes e, mais propriamente, a eles mesmos, está ligada à produção de uma estrutura celular chamada de glicocálix. O glicocálix é uma extensão da superfície celular (na verdade, a parte funcional dessa superfície) produzida através de uma seqüência multienzimática controlada, na qual há gasto energético por parte dos microrganismos. Este componente celular é formado por polissacarídeos, cuja constituição química varia de acordo com a espécie em questão, sendo que a adesão entre microrganismos parece ser função da afinidade química existente entre tais estruturas.

Após à instalação dos colonizadores primários, o metabolismo e o crescimento da comunidade tornam-se dependentes das condições locais. Os nutrientes presentes são, então, aprisionados à uma matriz gelatinosa formada sobre a superfície das bactérias (o glicocálix), estrutura esta que proporciona também a atração de outros microrganismos para o ambiente do filme bacteriano (BRYERS, 1988).

Havendo balanço apropriado de macro e micronutrientes, a evolução do biofilme continua e a estrutura começa a ser alterada por outras condições devido à dificuldade crescente de difusão dos gases formados no interior do filme e de difusão de nutrientes através da parede do sistema (CAMPOS, 1994). Um eventual estado de equilíbrio dinâmico estrutural e metabólico ocorre quando processos formadores são equilibrados por processos redutores do biofilme (BRYERS, 1988).

### **3.3.3. CINÉTICA DE BIOFILMES**

A evolução do biofilme depende da cinética dos processos que ocorrem em seu interior e, portanto, das concentrações de substratos e de metabólitos dos microrganismos que os compõem. O estudo da cinética dos processos que ocorrem em biofilmes está relacionado com o fluxo de substratos para o seu interior e com o fluxo dos produtos metabólicos no sentido inverso. A dificuldade de tal estudo aumenta quando são considerados comportamentos como a competição, a simbiose e

a natureza da cadeia alimentar, devido à presença em um mesmo biofilme de microrganismos que utilizam o mesmo substrato, que necessitam da ação simultânea dos mesmos microrganismos, ou ainda, que exigem ambientes completamente diversos entre si (CAMPOS, 1992).

A utilização de critérios empíricos em projeto e simulação dos reatores de células imobilizadas pode resultar em erros de projeto e em unidades sub-otimizadas. Entretanto, a obtenção de parâmetros fundamentais que permitam a utilização de critérios racionais para projeto de tais unidades são pouco estudados (ZAIAT, 1996).

No estudo de parâmetros cinéticos, deve-se considerar as contribuições dos fenômenos de transferência de massa e das reações bioquímicas para a velocidade global de consumo de substrato e, conseqüentemente, para a eficiência do processo. Torna-se claro, portanto, que os parâmetros cinéticos variam, tanto de acordo com a população estudada, quanto em função de características de retenção de biomassa e hidrodinâmicas de cada reator (ZAIAT, 1996).

BRYERS (1988) ressaltou, ainda, outros problemas na tentativa da obtenção de modelos cinéticos que elucidem os processos fermentativos em geral. A maioria dos modelos matemáticos propostos para estudos de biofilmes fundamentam-se nas leis de difusão de Fick, nas cinéticas de reações de ordem zero (em relação ao consumo de substrato), ou primeira ordem (em relação à concentração ativa de biomassa) e nas equações do tipo Monod. As hipóteses criadas, a título de simplificação matemática, no entanto, consideram a espessura do biofilme constante, apesar da presença evidente de crescimento celular. Outro erro cometido, é a consideração da existência de condições de regime dinâmico estável, superestimando, dessa maneira, o decaimento constante do biofilme. Esta suposição engloba, no conceito de crescimento endógeno, os processos de remoção de biofilme devido às forças de cisalhamento, a produção de polímeros extracelulares, despreedimento e predação, sendo que, normalmente, as características hidrodinâmicas são as maiores responsáveis pela manutenção da espessura do biofilme. Torna-se claro, novamente, a necessidade de estudos específicos para cada processo utilizado.

ZAIAT et al. (1996), estudando o desenvolvimento de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo, propuseram uma metodologia para a obtenção de parâmetros

cinéticos intrínsecos. A obtenção de tais parâmetros só é possível em condições nas quais a resistência aos processos de transferência de massa interna e externa ao biofilme são desprezíveis. Essas condições são verificadas fazendo-se uso de adimensionais como o número de Biot e o módulo de Thiele.

Quando as resistências externa e interna à transferência de massa são desprezíveis, a evolução do biofilme resulta do crescimento, morte e lise dos microrganismos presentes nessas estruturas e sua cinética será afetada por condições ambientais como temperatura, pH e alcalinidade.

### 3.3.4. COMPOSIÇÃO ESTRUTURA DO BIOFILME

Segundo GROTENHIUS, et al. (1991), a composição e estrutura de um biofilme muda consideravelmente em função do substrato fornecido às bactérias em questão.

Quando há fornecimento de substrato em quantidade e qualidade suficientes para o estabelecimento da seqüência de passos característicos da digestão anaeróbia, ou seja, hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese, pode-se encontrar biofilmes com estrutura estratificada, cujas camadas são compostas por diferentes tipos de organismos, agrupados de acordo com suas necessidades nutricionais e sintróficas.

GUIOT et al. (1991) estudaram grânulos (biomassa auto-imobilizada) provenientes de reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB), alimentado com sacarose e apresentaram um modelo de grânulo, com três camadas tróficas bem distintas. Após terminado o estudo, os autores concluíram que o modelo apresentado demonstra que a agregação microbiana otimiza a atividade conjunta dos microrganismos necessária para a condução de um processo eficiente de digestão anaeróbia, por reduzir a distância percorrida pelos metabólitos devido ao fenômeno da difusão.

Todas as observações realizadas por GUIOT et al. (1991) convergiram para concretizar teorias apresentadas previamente de que um grânulo anaeróbio seria um estruturado consórcio concêntrico. Nas três camadas encontradas no grânulo estudado, foi evidenciado, por utilização de microscopia eletrônica, que as associações microbianas sintróficas encontram-se na camada intermediária,

envolvidas por uma camada superficial de bactérias acidogênicas e, no centro, por culturas acetoclásticas metanogênicas.

Filmes microbianos com a presença de *Methanothrix sp* na superfície também foram encontrados por ROBINSON et al. (1986), que, porém, discordam totalmente do modelo proposto por GUIOT, et al. (1991). Os estudos realizados por ROBINSON et al. (1986) não comprovaram nenhuma organização lógica em função do consumo de substrato em biofilmes submetidos à microscopia eletrônica e de fluorescência, provenientes de sete reatores com recheios diferentes, todos alimentados com águas residuárias de suinocultura. Os reatores eram compostos por tubos de PVC, com volume útil de 5 litros e tempo de detenção hidráulico de 2 dias. As conclusões de tais pesquisas evidenciaram que a disposição das células componentes do biofilme foi aleatória e sua estrutura não uniforme.

Estudos realizados por ZAIAT (1996) em um reator horizontal anaeróbio de leito fixo, composto por espumas de poliuretano, evidenciaram a presença de três formas distintas de imobilização. Os microrganismos apresentaram-se como microgrânulos retidos mecanicamente nos poros da espuma de poliuretano e aderidos ao suporte, ou como células dispersas aderidas à partícula. O tamanho dos microgrânulos observados variou na faixa de 268 a 426  $\mu\text{m}$ , sendo que os menores grânulos foram encontrados no final do reator, em que a quantidade de substrato disponível era menor, maximizando os efeitos de transferência de massa externa. Foram observadas, através de análise de microscopia eletrônica, várias morfologias no filme aderido, dentre elas bacilos irregulares e cocos, além de organismos semelhantes ao gênero *Methanothrix*. Todavia, a conformação espacial dos microrganismos dentro do suporte diferiu claramente da conformação observada em grânulos por GUIOT et al. (1991), não revelando qualquer conformação bem estruturada. O autor acredita que a distribuição aparentemente caótica apresentada pelas formas microbianas no interior da espuma de poliuretano (ou seja, microrganismos dispostos ao lado de outros cujos metabólitos não os alimentam, ou que não se alimentam de seus metabólitos), diferente da proposta por GUIOT et al (1991), pode ser um importante fator na geração de curtos períodos de partida, por resultar em utilização ótima de substratos primários e produtos intermediários.

### 3.3.5. TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM BIOFILMES

O estudo da transferência de massa em filmes biológicos é de suma importância, já que a remoção de substrato contido na fase líquida requer sua difusão para o interior do biofilme, onde ocorrem as reações metabólicas dos microrganismos que governam a degradação da matéria orgânica. Os produtos finais do metabolismo dos microrganismos são, posteriormente, difundidos para fora do biofilme ou utilizados em reações subsequentes.

Segundo SHIEH (1981), devido a, virtualmente, toda biomassa presente em um sistema de células imobilizadas ser parte desse sistema, substratos devem ser transportados ao longo das partícula antes de serem metabolizados. Em uma simples e geral visão, três passos podem ser identificados nesse processo:

- 1) o transporte do substrato do líquido para o biofilme através da camada limite,
- 2) o transporte do substrato (ou metabólitos) através do biofilme e
- 3) a conversão do substrato no interior do biofilme

O transporte do substrato, do líquido aos microrganismos, é dificultado pela presença da estrutura gelatinosa característica dos biofilmes, além do efeito da camada limite, presente na interface sólido / líquido, onde a velocidade superficial de escoamento tende a ser nula, ocasionando um aumento da resistência à transferência de massa.

Segundo BAILEY e OLLIS (1986), para a representação da extensão das resistências à transferência de massa em sistemas heterogêneos é utilizado o fator de efetividade, previamente definido por THIELE, como sendo, fisicamente, a razão entre a velocidade de consumo de substrato observada e a velocidade obtida, caso a resistência a transferência de massa externa fosse nula; dessa maneira, a concentração de substrato na superfície do biofilme seria igual à do meio líquido.

A velocidade de utilização de substrato observada é igual ao transporte de massa extra e intraparticular em regime permanente. A velocidade que seria obtida se não houvesse gradiente de concentração, é expressa em função da concentração de substrato na fase líquida, e pode seguir modelo cinético tipo Monod, ordem zero, primeira ordem, ou outro modelo adequado.

Para a avaliação do fator de efetividade, um balanço de massa em uma biopartícula deve ser realizado, combinando os processos de transferência e reacionais. Tal procedimento visa a obtenção de expressões que correlacionem a concentração de determinada substância no interior da partícula e na interface, com os coeficientes de transferência de massa, os parâmetros cinéticos intrínsecos e as características geométricas da partícula.

A avaliação do fator de efetividade é de extrema importância para avaliação da velocidade global de reação, já que quantifica os valores das velocidades de transferência de massa em relação aos valores das velocidades das reações bioquímicas.

Vários modelos cinéticos podem ser utilizados para a avaliação do fator de efetividade; porém, como a velocidade de reação, presente no balanço de massa, não varia de maneira linear, a utilização de adimensionais como o módulo de Thiele torna-se interessante, já que seu valor relaciona as velocidades de reações de primeira ordem com as velocidades de difusão.

Devido à dificuldade de disponibilidade de parâmetros cinéticos intrínsecos necessários para a obtenção do valor do módulo de Thiele, BAILEY e OLLIS (1986) propuseram a utilização do módulo de Thiele observado, que leva em consideração a taxa de utilização de substrato observada, sendo um adimensional com variáveis mensuráveis, cujo valor, sendo inferior a 0,3, pode-se desprezar o efeito da transferência de massa intraparticular.

Para a obtenção da relação entre a velocidade de transporte de massa na camada líquida estagnada ao redor da partícula (camada limite) com a velocidade de difusão intraparticular, a utilização de outro adimensional, o número de Biot, faz-se necessária, sendo que se  $Bi \geq 100$  os efeitos de resistência externa à transferência de massa não são significativos.

De acordo com DROSTE E KENNEDY (1985), a aplicação de um modelo considerando um substrato simples sendo utilizado por um conjunto de microrganismos que interagem sintroficamente (como é o caso da estabilização anaeróbia da matéria orgânica) ocasionará erros, já que a produção de um metabólito no biofilme melhora a habilidade de conversão do grupo utilizador de tal substância.

Por esse motivo, foi desenvolvido, pelos citados autores, um fator de efetividade modificado, levando tal fato em consideração.

### 3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a grande importância dos reatores biológicos de leito fixo para o tratamento de águas residuárias, torna-se evidente a necessidade de freqüentes estudos para a maior compreensão do componente mais importante desses sistemas, o biofilme.

É fato que grande parte da matéria orgânica presente no esgoto sanitário é constituída por proteínas, e dada a complexidade de suas moléculas, esse tipo de matéria orgânica torna-se fator limitante aos processos biológicos de tratamento de águas residuárias em que se encontram presentes. Em vista disso, a estimativa de parâmetros cinéticos do processo de degradação anaeróbia pode ser de grande valia para projetos de reatores de leito fixo para o tratamento de águas residuárias com grandes frações protéicas, como os efluentes de abatedouros de bovinos, suínos e aves, além de laticínios, entre outros casos.

Sabendo-se do potencial da espuma de poliuretano para a adesão de consórcios microbianos, optou-se por sua utilização na avaliação qualitativa da evolução do biofilme anaeróbio proteolítico com objetivo de elucidar o mecanismo de degradação das proteínas com o aumento de conhecimento sobre os mecanismos de formação do biofilme proteolítico, já que na literatura consultada não foram encontradas referências relacionando tais assuntos.

Enfim, este estudo pretende preencher uma lacuna existente na literatura a respeito da degradação anaeróbia de proteínas em reatores de filme fixo, já que não foram encontradas referências fazendo alusão à cinética de degradação de proteínas neste tipo de reator, e nem em relação à composição e desenvolvimento do biofilme proteolítico.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***4.1. DESCRIÇÃO DOS REATORES DIFERENCIAIS***

Para a realização do presente trabalho, foram utilizados reatores diferenciais com volume de 15,8 ml, 2,9 cm de diâmetro interno e 2,4 cm de comprimento. O escoamento nos reatores era horizontal. Na entrada e na saída dos reatores foram dispostas redes de plástico para o impedimento de possíveis perdas de biomassa. O material para a confecção dos reatores foram seringas plásticas de 60 ml ( cortadas no referido tamanho), de polipropileno.

### ***4.2. MATERIAL SUPORTE***

O material utilizado para a composição do leito fixo do reator foi espuma de poliuretano com densidade 20 Kg.m<sup>-3</sup>. Este material foi utilizado em forma de cubos com 5 mm de aresta.

### ***4.3. SUBSTRATO***

O substrato utilizado ao longo de todos os experimentos foi sintético, com gelatina como única fonte de carbono. A DQO inicial do substrato era de aproximadamente 500 mg / L. Para o correto balanceamento nutricional microbiano, o substrato continha também, sais minerais de acordo com a Tabela 4.1

Tabela 4.1: Composição de sais minerais presentes no substrato sintético utilizado no experimento

SAIS	Concentração (mg/l)
Cloreto de cálcio	47,0
Fosfato de potássio monobásico	8,5
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Sulfato ferroso	5,0
Fosfato de sódio dibásico	33,4
Sulfato de níquel	1,0
Cloreto férrico	0,5
Óxido de selênio	0,07
Cloreto de cobalto	0,08

Fonte: Laboratório de Processos Biológicos.

#### 4.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foram realizadas seguindo métodos descritos pela APHA.(1989), as análises de alcalinidade como  $\text{CaCO}_3$  foram realizadas de acordo com metodologia descrita por RIPLEY et al (1986). A quantificação de proteínas foi realizada segundo metodologia descrita por LOWRY e modificada por PETERSON (1987), e a quantificação de nitrogênio foi realizada pela metodologia de KJELDHAL.

##### 4.4.1. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY MODIFICADO POR PETERSON (1977)

###### REAGENTES:

- 1) Solução A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2%) em solução 0,1 N de Na OH;
- 2) Solução B:  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5%);
- 3) Solução C: Tartarato de Sódio e Potássio (1%);
- 4) Solução D: Mistura das soluções B e C em partes iguais com 5 partes da solução A;
- 5) Solução E: Reagente de Folin-Cicauteu.

###### PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

- 1) Adicionar em tubos de ensaio: 0,5 mL de amostra e 5 mL de solução D, agitar e proteger da luz no escuro por 20 minutos.
- 2) Adicionar a cada tubo 0,5 mL de Reagente de Folin-Cicauteu com diluição 1:1 em água milliQ, agitar e proteger da luz por 30 minutos.

3) Ler as absorvâncias das amostras em espectrofotômetro com comprimento de onda de 750 nm.

OBS: O branco deve ser preparado da mesma maneira, porém a amostra deve ser substituída por solução de NaOH 0,1 N.

#### **4.5. EXAMES SOB MICROSCOPIA**

##### **4.5.1. EXAME SOB MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

As amostras para este exame eram espumas retiradas do RAHLFd contendo o biofilme a ser examinado, com cuidado para que sua estrutura fosse mantida o mais intacta possível. Posteriormente as matrizes foram submetidas a técnica desenvolvida por NATION apud ARAÚJO (1995) e adaptada para biofilmes bacterianos por ARAÚJO (1995).

Inicialmente, as células foram fixadas permanecendo em solução tampão fosfato com concentração 0,1M (pH = 7,3), contendo 2,5% de glutaraldeído, durante 12 horas, na temperatura de 4° C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três lavagens com duração de 10 minutos cada, com a já citada solução tampão fosfato, e expostas a soluções de etanol a 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% (3 vezes) durante 10 minutos a cada concentração, para desidratação. O próximo procedimento foi a exposição das biopartícula por 30 segundos à solução de hexametildesilazane (HMDS) para pós-fixação. As amostras foram, então, secas em estufa à temperatura de 60° C durante duas horas e cobertas com ouro, para, finalmente, serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura digital Zeiss DMS-960.

##### **4.5.2. EXAMES SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ COMUM**

As amostras foram observadas ao microscópio óptico sob contraste de fase e fluorescência para observação de culturas metanogênicas. Para essas análises, a biomassa foi desprendida do material suporte e depositada em lâminas com ágar gel a 1%, no caso da microscopia de contraste fase. Já para a microscopia de fluorescência, as lâminas foram preparadas sem gel ágar. O desprendimento da biomassa foi realizado de duas maneira: espremendo-se a espuma contra a lâmina

com auxílio de uma pinça, ou agitando algumas espumas em água destilada em pequenos frascos fechados.

#### **4.6. DESENHO EXPERIMENTAL**

A presente pesquisa foi desenvolvida em duas etapas. Primeiramente, estimaram-se os parâmetros cinéticos aparentes de degradação anaeróbia de substrato sintético contendo gelatina como única fonte de carbono orgânico. Esta fase teve duração de aproximadamente 65 dias, incluindo um período de 12 dias de adaptação das células utilizadas. O lodo biológico anaeróbio utilizado nessa etapa já se encontrava aderido à espumas de poliuretano provenientes de um RAHLF de bancada utilizado anteriormente por SARTI (1998), para estudo da degradação anaeróbia de substrato sintético simulando esgoto sanitário. Posteriormente, a partir do inóculo proveniente do primeiro experimento, monitorou-se durante 21 dias o desenvolvimento do biofilme proteolítico sob condições de anaerobiose estrita, e após mais cinco dias de operação, estimou-se os parâmetros cinéticos aparentes da biomassa, cujo desenvolvimento foi acompanhado. Nos itens a seguir, será descrito o desenho experimental das duas etapas deste trabalho científico.

##### **4.6.1. ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE SUBSTRATO SINTÉTICO CONTENDO GELATINA COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO (lodo proveniente de RAHLF de bancada – Sarti, 1998).**

Para a estimativa dos parâmetros cinéticos aparentes (taxa de utilização de substrato e  $K_s^{app}$ ) de degradação anaeróbia de proteínas, utilizou-se o aparato experimental desenvolvido por ZAIAT (1996) para a estimativa de parâmetros cinéticos intrínsecos. O desenho esquemático de tal aparato está apresentado na figura 4.1.

Durante os experimentos, 500 ml de substrato sintético foram mantidos sob agitação constante e temperatura inferior a 5 ° C, graças a um banho de gelo, para a minimização de ocorrência de reações bioquímicas no exterior do reator, sendo que pela ação de uma serpentina no interior do banho maria, ao chegar ao reator o substrato apresentava a temperatura de 30°C.

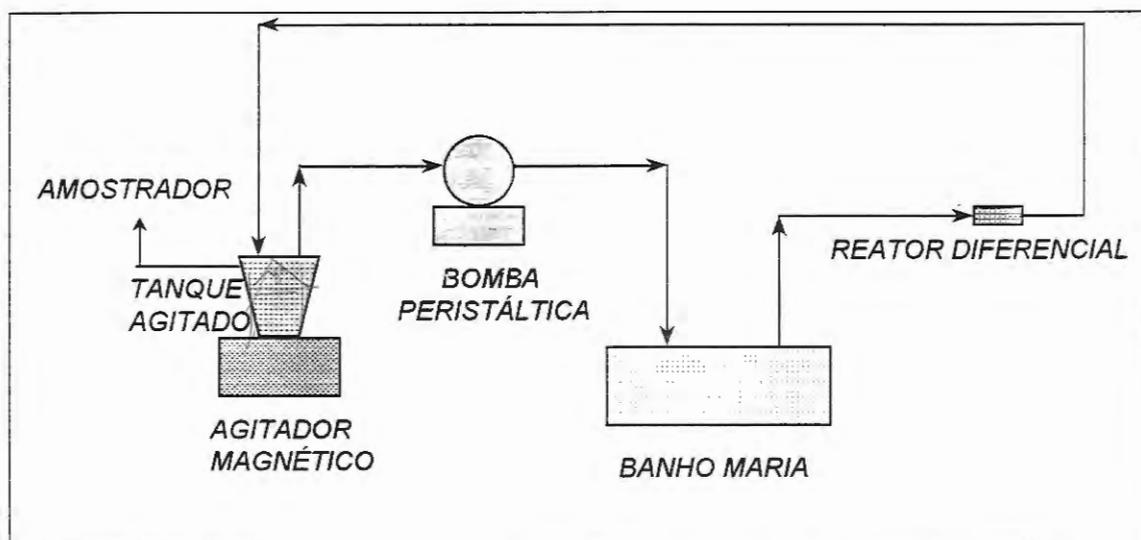


Figura 4.1: Esquema do aparato experimental utilizado na determinação de parâmetros cinéticos aparentes da degradação anaeróbia de gelatina de lodo previamente imobilizado

Foram realizados 6 experimentos em duplicata ou triplicata, com velocidades superficiais variando na faixa de 0,023 a 0,11 cm/s. Os experimentos tinham duração de 10 ou 12 horas. Durante este período, o substrato era feito escoar em circuito fechado por uma bomba peristáltica Watson Marlow 100. A cada 2 horas, foram retiradas alíquotas de 6 ml de meio líquido, diretamente do frasco de alimentação do sistema. As amostras eram, então, submetidas às análises de DQO e concentração de proteínas que permitiram a obtenção dos perfis de decaimento de substrato necessários à estimativa dos parâmetros cinéticos aparentes.

Antes do início de cada experimento, a atmosfera nos frascos de alimentação era trocada por gás nitrogênio ( $N_2$ ), para a garantia de total anaerobiose no sistema.

Do total de experimentos realizados, somente 4 foram aproveitados por razões descritas no capítulo de resultados e discussões

Após a obtenção dos perfis temporais de decaimento de substrato, pôde-se partir para a estimativa dos parâmetros cinéticos aparentes segundo metodologia desenvolvida por Zait (1996), descrita brevemente a seguir.

Inicialmente, obtiveram-se as velocidades globais de utilização de substrato observadas ( $R_{obs}$ ), para cada valor de  $v_s$  aplicado, da seguinte forma:

$$R_{obs} = - \frac{d(DQO)}{dt}, \quad (4.1)$$

$$R_{\text{obs}} = - \frac{d[\text{prot.}]}{dt} \quad (4.2)$$

A velocidade específica de consumo de substrato ( $r_{\text{obs}}$ ) foi então obtida da seguinte forma:

$$r_{\text{obs}} = R_{\text{obs}} / \text{Volume de suporte} \quad (4.3)$$

Através dos valores de  $r_{\text{obs}}$ , em função da DQO e [prot.], foi possível avaliar o efeito dos valores de  $v_s$  sobre a resistência à transferência de massa na fase líquida.

Posteriormente, estimou-se o valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa na fase líquida ( $k_s a$ ), a partir de correlação obtida por ZAIAT (1996)

$$k_s a = -0.244 + 0.271 e^{(1.796 * v_s)} \quad (4.4)$$

O coeficiente de transferência de massa na fase líquida ( $k_s$ ) foi então obtido através da expressão:

$$k_s = k_s a / a, \quad (4.5)$$

em que a área interfacial de transferência de massa é calculada segundo a expressão:

$$a = A_p * V_L / n, \quad (4.6)$$

em que  $A_p$  é a área superficial média da partícula,  $V_L$  é o volume de líquido no reator e  $n$  é o número de partículas presentes no sistema.

O próximo passo foi o cálculo do número de Biot (Bi) da seguinte forma:

$$Bi = k_s * R_p / De, \quad (4.7)$$

em que  $R_p$  é o raio da esfera de mesmo volume que a partícula cúbica e  $De$  a difusividade efetiva estimada a partir da expressão:

$$De = 0,1573 * M^{-0,3858}, \quad (4.8)$$

em que M é a massa molecular da molécula de proteína.

A expressão 4.8. foi obtida através da Tabela 4.2, que correlaciona a difusividade de proteínas em meio líquido de proteínas com sua massa molecular. A difusividade efetiva de proteínas em biofilmes foi obtida multiplicando-se o valor da difusividade em meio líquido pelo fator 0,8 sugerido por WILLIAMSON & McCARTY apud DROSTE & KENNEDY (1985)

Massa Molecular	Difusividade (cm <sup>2</sup> /s)
10	2,2 . 10 <sup>-5</sup>
100	7,1 . 10 <sup>-6</sup>
1000	2,5 . 10 <sup>-6</sup>
10000	1,1 . 10 <sup>-6</sup>
100000	5,0 . 10 <sup>-7</sup>
1000000	2,5 . 10 <sup>-7</sup>

FONTE: Perry & Chilton (1973)

Seguiu-se, então, a estimativa dos parâmetros cinéticos aparentes de modelo de consumo de substrato semelhante à equação de Monod equação de Monod:

$$r = r_{\text{máx}}(S)/(K_s + S), \quad (4.9)$$

a partir da linearização de Hanes-Woolf:

$$r/S = (r_{\text{máx}}) \cdot 1/(K_s + S) \quad (4.10)$$

Para efeito de comparação estimou-se também o parâmetro cinético de equação de primeira ordem para consumo de substrato de acordo com a equação (4.11):

$$\text{LN}(S) = \text{LN}(S_0) - k_1 t \quad (4.11)$$

Iniciou-se então a tentativa de determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos do modelo semelhante à equação de Monod, que não foi possível devido

a confirmação da impossibilidade de desprezo da resistência a transferência de massa interna do processo. Optou-se pela continuidade de demonstração dos cálculos, devido à importância desses resultados para as conclusões desse trabalho.

A tentativa de estimativa dos parâmetros cinéticos intrínsecos, velocidade específica de consumo de substrato ( $r_{m\acute{a}x}$ ), e da constante de saturação de substrato da equação de Monod ( $K_s$ ) seguiu seguinte sequência:

✓ inicialmente, para cada valor de  $v_s$  utilizado foram gerados valores de  $r_{obs}$ , fixando-se valores de DQO e [prot.], utilizando-se a expressão cinética do tipo Monod e os coeficientes cinéticos aparentes estimados previamente.

✓ os valores de  $r_{obs}$ , foram correlacionados com o inverso do número de Biot, para diferentes valores de DQO e [prot.].

✓ a partir da extrapolação da correlação de  $r_{obs}$  em função de  $Biot^{-1}$ , obteve-se o valor da velocidade específica de utilização de substrato que seria observada caso não houvesse resistência externa à transferência de massa.

✓ Calcularam-se então, os valores do módulo de Thiele observado para cada valor de DQO e [prot.] utilizados, para a verificação da interferência dos efeitos da transferência de massa na fase sólida.

$$\phi_{obs} = (R_{obs}/De * Sb) * (Vp/Ap)^2$$

(4.12)

#### **4.6.2. ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME ANAERÓBIO PROTEOLÍTICO**

Para esta fase do experimento, foram utilizados 4 reatores diferenciais operando em paralelo, como ilustrado na Figura 4.2.

O inóculo para esta etapa do experimento foi proveniente de 1200 mL de água residuária do experimento anterior, guardada sob refrigeração para este fim. O volume de água residuária foi centrifugado durante 15 minutos, com velocidade de 5000 rpm. O precipitado resultante de tal operação foi então adicionado ao substrato líquido utilizado para iniciar a alimentação dos quatro RAHLFDs utilizados para o acompanhamento do desenvolvimento do biofilme anaeróbio proteolítico

Como inóculo, foram utilizadas células provenientes dos precipitados procedentes da centrifugação durante 15 minutos com velocidade de 5000 rpm de 1,2 L de água residuária do experimento anterior.

O substrato também foi mantido a 5° C e sob agitação constante durante todo o experimento, que transcorreu com temperatura de 30° C.

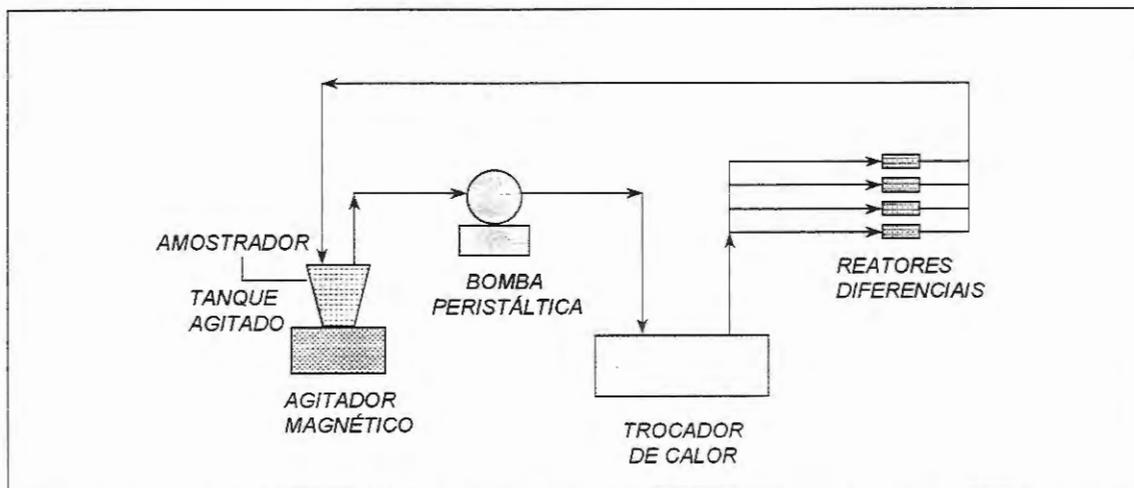


Figura 4.2. Esquema do aparato experimental para o acompanhamento da formação do biofilme proteolítico.

Os frascos de alimentação do sistema eram semelhantes aos utilizados no experimento de estimativa de parâmetros cinéticos aparentes, porém com volume de 2 L (500 mL / reator)

O substrato era recirculado em circuito fechado com velocidade superficial de aproximadamente 0,023 cm /s e, a cada 24 horas, eram colhidas amostras para análise de DQO. Quando a quantidade de matéria orgânica chegava a níveis mínimos (30 – 50 mg DQO/L), o substrato era substituído por outro com a DQO inicial já citada.

Aproximadamente a cada 5 dias, um reator foi aberto para a retirada de amostras para os exames sob microscopia.

Cinco dias após a abertura do último reator, realizou-se experimento para a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes de degradação de gelatina do biofilme formado, de maneira descrita anteriormente no item 4.6.1. O período de 5 dias foi necessário para a adaptação dos reatores à uma velocidade superficial de escoamento de 0,043 cm/s, ligeiramente superior à utilizada anteriormente durante o monitoramento do desenvolvimento do biofilme proteolítico. Neste experimento,

também foram monitoradas a quantidade total de nitrogênio e alcalinidade total do sistema. Este ensaio cinético foi realizado em 2 dias, já que utilizou-se somente uma velocidade superficial de escoamento.

#### **4.6.3. PROCEDIMENTO DE TROCA DE ATMOSFERA**

A troca de atmosfera dos frascos de alimentação ilustrada na Figura 4.3. era realizada através do borbulhamento de nitrogênio no substrato líquido, durante 10 minutos para cada 500 mL de substrato utilizado.

Os frascos utilizados nesse experimento eram frascos de Duran com três furos na tampa, onde eram encaixadas três cânulas de vidro, duas com comprimento suficiente para atingir o fundo do frasco (uma ligada à linha de sucção da bomba peristáltica e outra para amostragem de líquido), e a terceira, que permanecia na parte superior do frasco a cima do nível de líquido (ligada à linha de recalque da bomba peristáltica).

No procedimento de troca de atmosfera, o gás nitrogênio era injetado pela cânula destinada para a sucção do substrato e escapava pela cânula destinada ao recalque. Durante todo o tempo de troca de atmosfera, a cânula destinada à amostragem permanecia fechada, e o substrato mantido sob agitação. Dessa maneira o gás permeava todo o líquido, garantindo a anaerobiose, tanto do substrato, quanto da atmosfera do frasco.

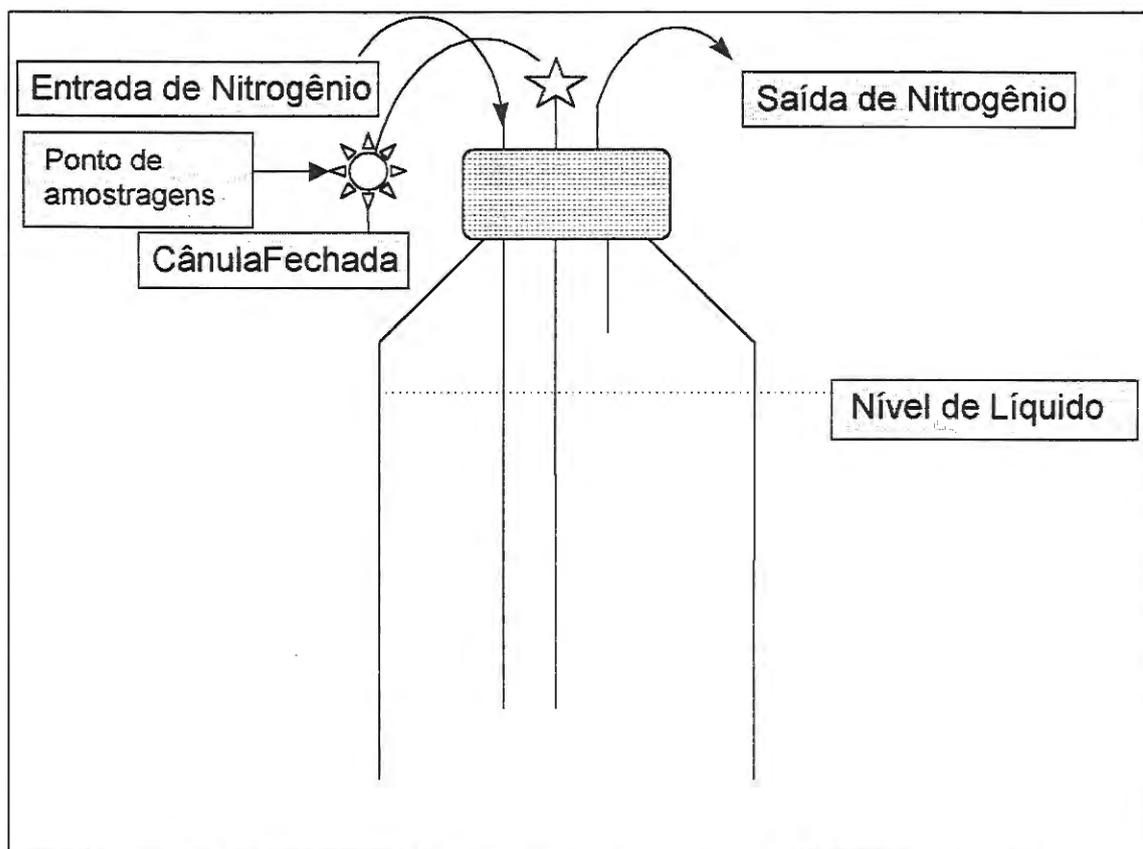


Figura 4.3: Ilustração do procedimento de troca de atmosfera do frascos de alimentação.

#### 4.6.4. PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM

O procedimento de amostragem realizado a cada duas horas seguia os seguintes passos:

- 1) Injeção de 4 ml de nitrogênio para a limpeza da cânula de amostragem.
- 2) Retirada de 6 ml de amostra do substrato líquido.
- 3) Injeção de 2 ml de nitrogênio para equilíbrio da pressão do sistema.

O procedimento de amostragem era realizado com auxílio de duas seringas conectadas a uma agulha permanentemente fixa à cânula de amostragem para que o sistema não fosse contaminado com oxigênio.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ***5.1. ENSAIO DE ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE GELATINA (com lodo proveniente de RHALF tratando substrato sintético simulando esgoto sanitário (SARTI,1998))***

#### 5.1.1. PERÍODO DE ADAPTAÇÃO

As matrizes contendo o lodo utilizado nesta fase experimental foram obtidas de um reator de bancada utilizado anteriormente para o estudo da degradação anaeróbia de substrato sintético simulando esgoto sanitário. Inicialmente, portanto, realizou-se um período de adaptação com duração de 12 dias. A cada 48 horas o substrato fornecido ao RHALFd foi trocado e obteve-se então os perfis temporais de decaimento de substrato (Sb expresso em DQO), apresentados nas Figuras 5.1 a 5.5., das cinco bateladas de adaptação realizadas. A DQO inicial do substrato fornecido era, aproximadamente, 500 mg/L. As análises de DQO foram realizadas com e sem filtração prévia para monitoramento do desprendimento de sólidos provenientes das espumas de poliuretano. Pode-se observar na Figura 5.5 (representativa do fim do período de adaptação) que quase não há diferença entre os pontos experimentais citados. Além desse critério, o que determinou o final da fase de adaptação do lodo foi a quantidade de matéria orgânica presente ao final de cada batelada de adaptação. Na Figura 5.6 encontra-se demonstrado como as curvas provenientes dos perfis das duas últimas bateladas foram coincidentes

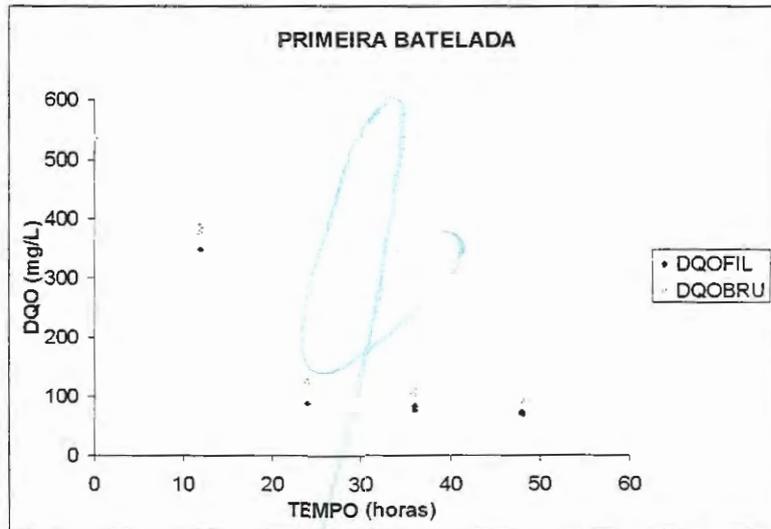


Figura 5.1 Valores do conteúdo de Sb (substrato na fase líquida expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para a primeira batelada de adaptação.

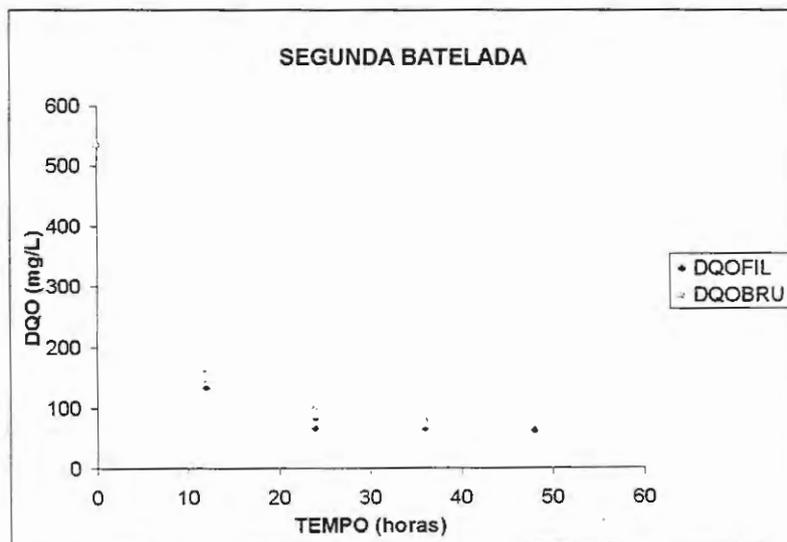


Figura 5.2: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para a segunda batelada de adaptação.

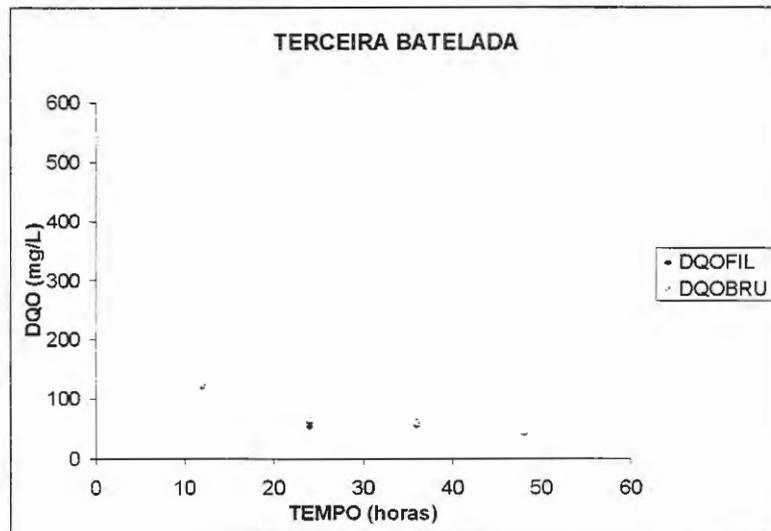


Figura: 5.3 Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para a terceira batelada de adaptação.

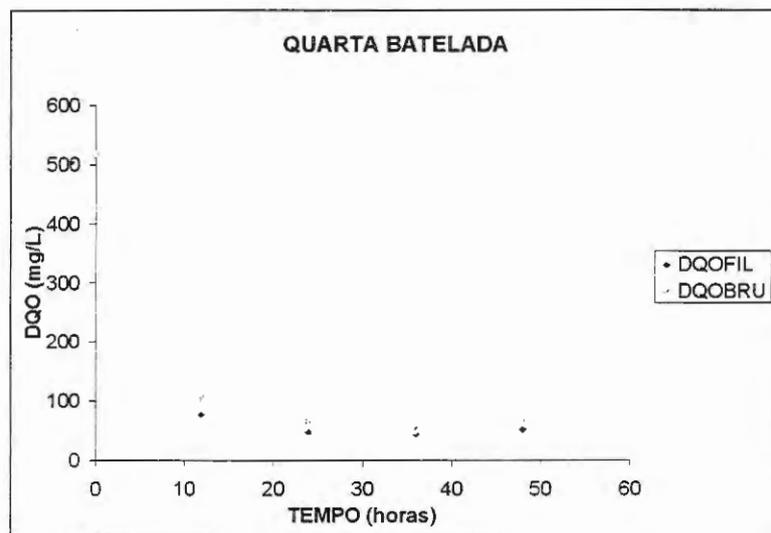


Figura 5.4 Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para a quarta batelada de adaptação.

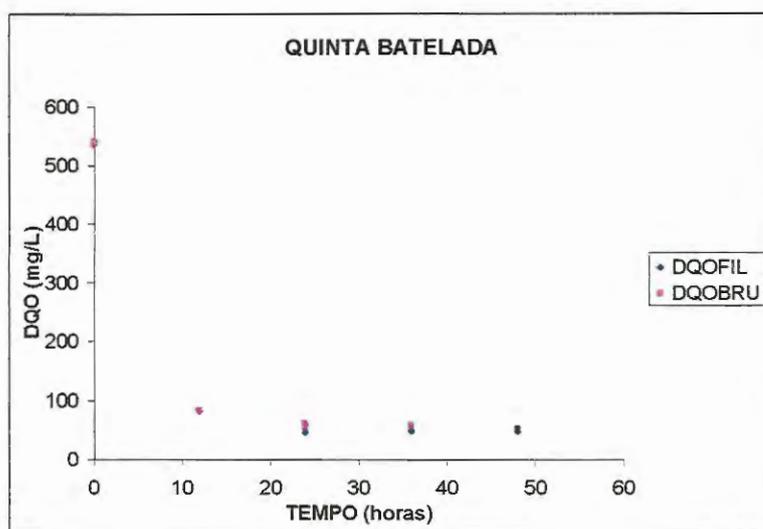


Figura 5.5 Valores do conteúdo de  $S_b$  (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para a quinta batelada de adaptação.

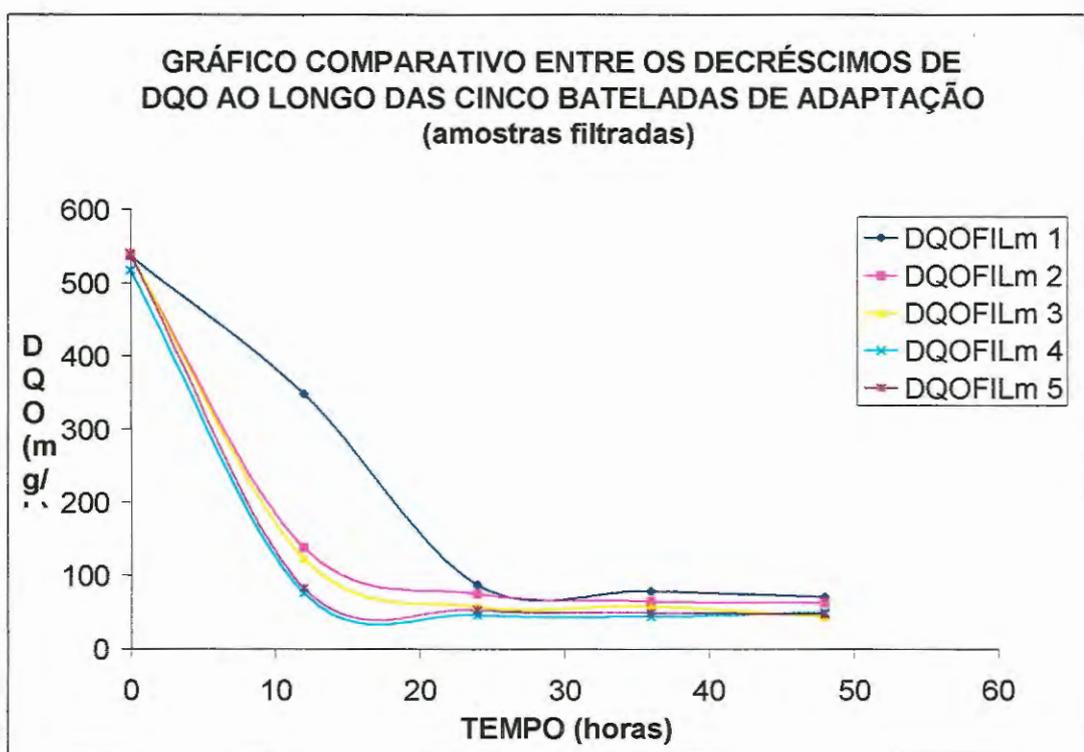


Figura 5.6 Valores do conteúdo de  $S_b$  médio (expresso em DQO – mg / L) para as cinco bateladas de adaptação do lodo

A partir de então, e após dois dias de operação semelhante à fase de adaptação transcorridos sem análises, decidiu-se dar início à fase experimental de determinação dos parâmetros cinéticos de degradação anaeróbia de gelatina

### 5.1.2. PERÍODO DE OPERAÇÃO

Nas Tabelas 5.1 e 5.2 encontram-se os valores das médias dos pontos experimentais obtidos para cada velocidade superficial aplicada no RHALFd ao longo do experimento. Tendo o experimento sido realizado em duplicata, ou triplicata para o valor mais elevado de velocidade superficial utilizado, as siglas r1 e r2 e r3 indicam o número das réplicas em ordem de realização.

A partir dos pontos experimentais obtidos, pode-se traçar os perfis temporais de consumo de substrato, expressos em DQO e quantidade total de proteínas, apresentados nas figuras 5.7 a 5.33. A cada perfil ajustou-se um polinômio de segundo grau, cujas expressões (5.1 a 5.26) e respectivos coeficiente de correlação do ajuste ( $R^2$ ) serão apresentadas após cada figura representativa dos perfis temporais obtidos.

Tabela 5.1 Concentração de substrato na fase líquida ( $S_b$  expresso em DQO) em função do tempo para diferentes velocidades experimentais ( $v_s$ ) aplicadas no RHALFd. ao longo do experimento

t (h)	Vs (cm/s)												
	0,023		0,045		0,058		0,067		0,089		0,11		
	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r3
0	516	532	536	541	533	530	543	546	538	542	531	496	483
2	418	422	466	432	477	435	425	450	471	446	442	445	441
4	351	351	419	399	413	399	338	366	397	376	399	394	401
6	279	267	358	354	356	339	247	278	342	294	356	326	313
8	206	196	282	268	306	280	176	181	262	214	290	228	207
10	156	141	181	163	257	215	86	108	184	117	167	126	97
12			--	94					--	67			

Tabela 5.2 Concentração de substrato na fase líquida (Sb expresso em concentração total de proteínas – mg SAB/L) em função do tempo para diferentes velocidades experimentais ( $v_s$ ) aplicadas no RHALFd. ao longo do experimento

t (h)	$V_s$ (cm/s)												
	0,023		0,045		0,058		0,067		0,089		0,11		
	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r3
0	298	292	327	328	288	271	305	304	336	343	263	303	289
2	253	244	263	269	239	224	251	228	279	274	239	274	266
4	233	214	235	232	193	223	208	196	241	226	231	251	235
6	176	171	200	189	170	191	160	154	212	175	205	194	199
8	140	124	159	151	129	181	117	109	177	130	154	138	153
10	114	104	124	111	--	156	91	69	141	82	118	92	101
12									--	60			

Nas Figuras 5,7 a 5,32 serão apresentados os perfis temporais de consumo de substrato, expressos em DQO e quantidade total de proteínas, obtidos no ensaio realizado com intuito de obtenção de parâmetros cinéticos (taxa de utilização de substrato ( $r_{m\acute{a}x}$ ) e constante de saturação de substrato de modelo cinético tipo Monod ( $K_s$ )) de degradação anaeróbia de gelatina.

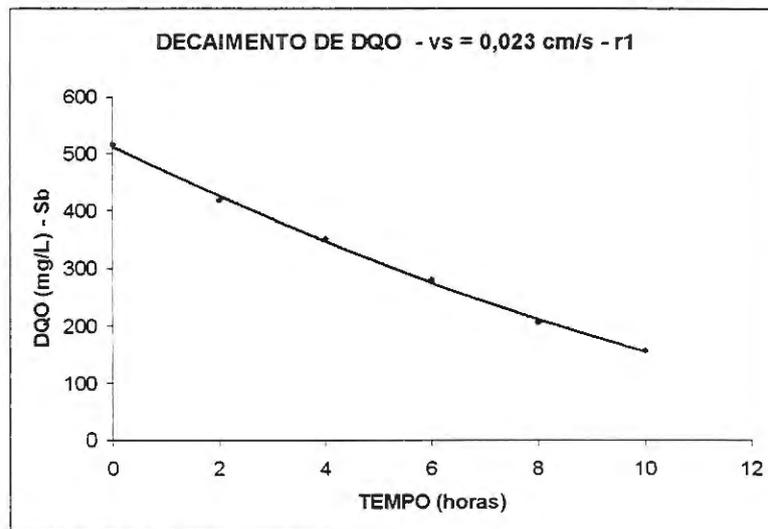


Figura 5.7: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,023 cm/s (•) e expressão (5.1) ajustada (—).

$$S_b = 0,9554t^2 - 45,325t + 512,43 \quad (5.1)$$

$$R^2 = 0,9984$$

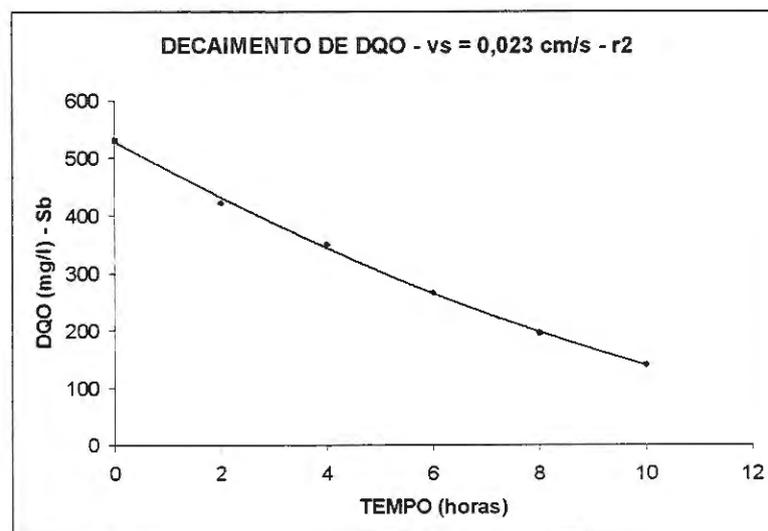


Figura 5.8: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,023 cm/s (•) e expressão (5.2) ajustada (—).

$$S_b = 1,2254t^2 - 51,097t + 528,55 \quad (5.2)$$

$$R^2 = 0,99$$

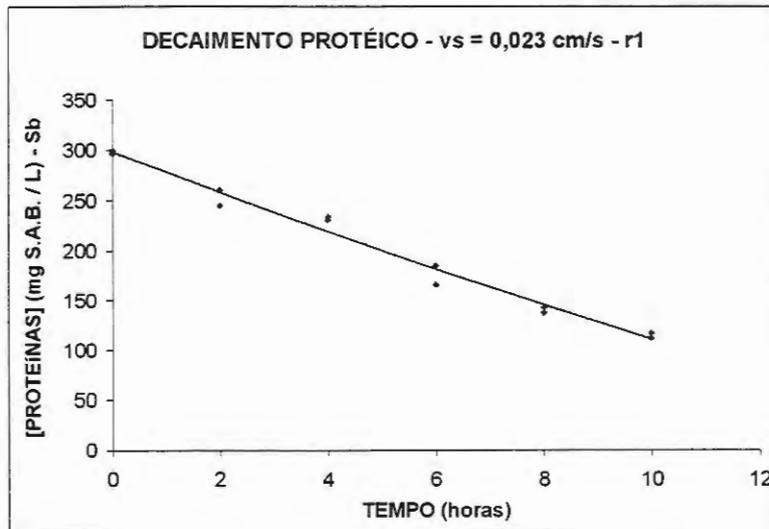


Figura 5.9: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,023 cm/s (●) e expressão (5.3) ajustada (—).

$$S_b = 0,1559t^2 - 20,384t + 298,35 \quad (5.3)$$

$$R^2 = 0,9819$$

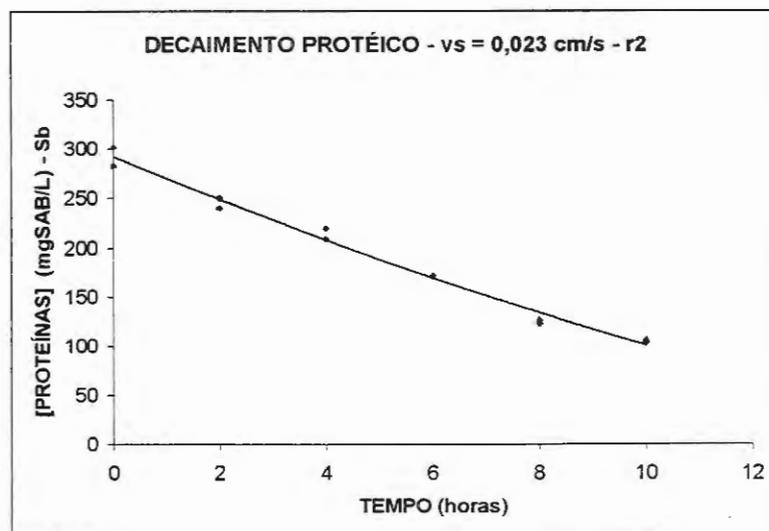


Figura 5.10: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,023 cm/s (●) e expressão (5.4) ajustada (—).

$$S_b = 0,3142t^2 - 22,274t + 291,54 \quad (5.4)$$

$$R^2 = 0,9882$$

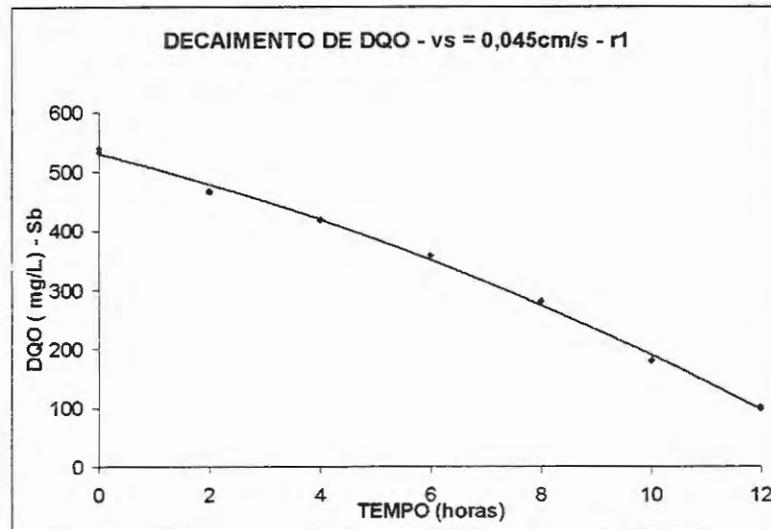


Figura 5.11: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,045 cm/s (•) e expressão (5.5) ajustada (—).

$$S_b = -1,0327t^2 - 23,554t + 529,52 \quad (5.5)$$

$$R^2 = 0,9972$$

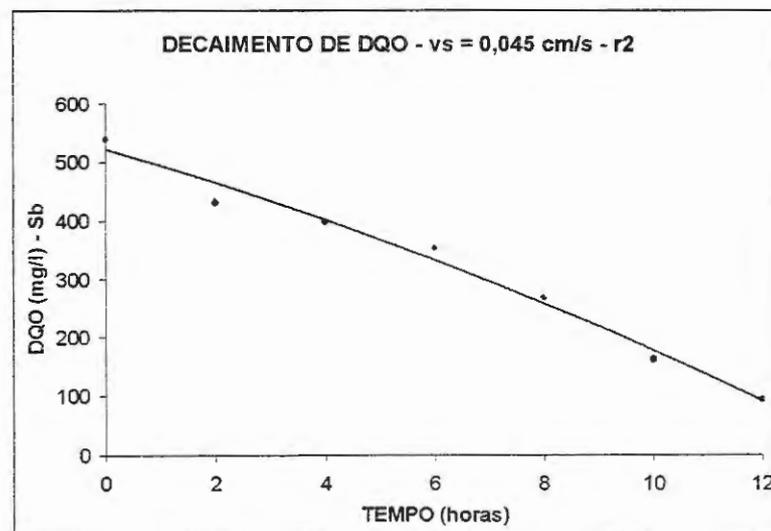


Figura 5.12: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,045 cm/s (•) e expressão (5.6) ajustada (—).

$$S_b = -0,7262t^2 - 27,196t + 522,15 \quad (5.6)$$

$$R^2 = 0,985$$



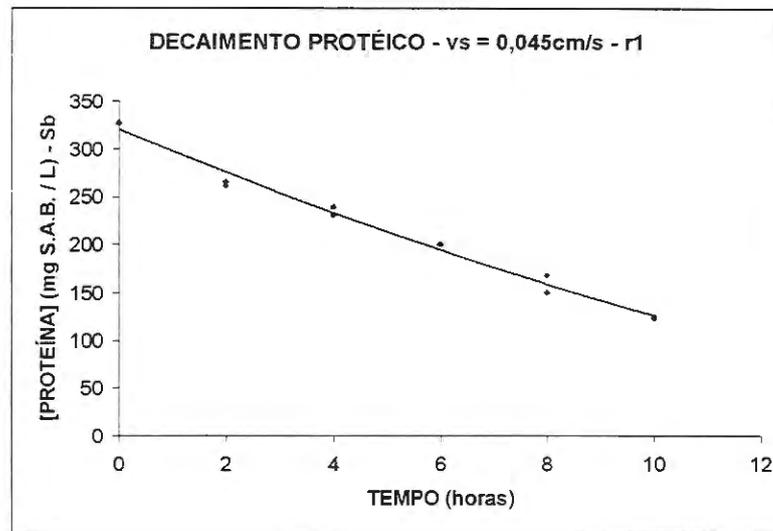


Figura 5.13: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,045 cm/s (●) e expressão (5.7) ajustada (—).

$$Sb = 0,4204t^2 - 23,698t + 321,17 \quad (5.7)$$

$$R^2 = 0,9878$$

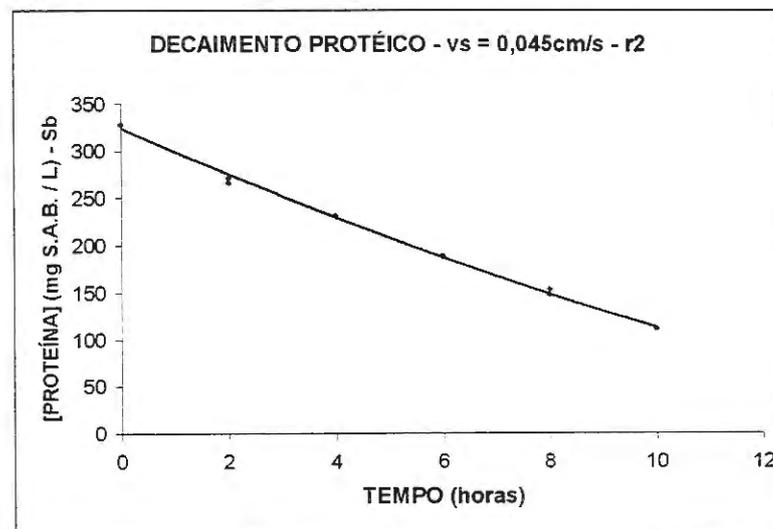


Figura 5.14: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,045 cm/s (●) e expressão (5.8) ajustada (—).

$$Sb = 0,4055t^2 - 25,18t + 324,27 \quad (5.8)$$

$$R^2 = 0,9972$$

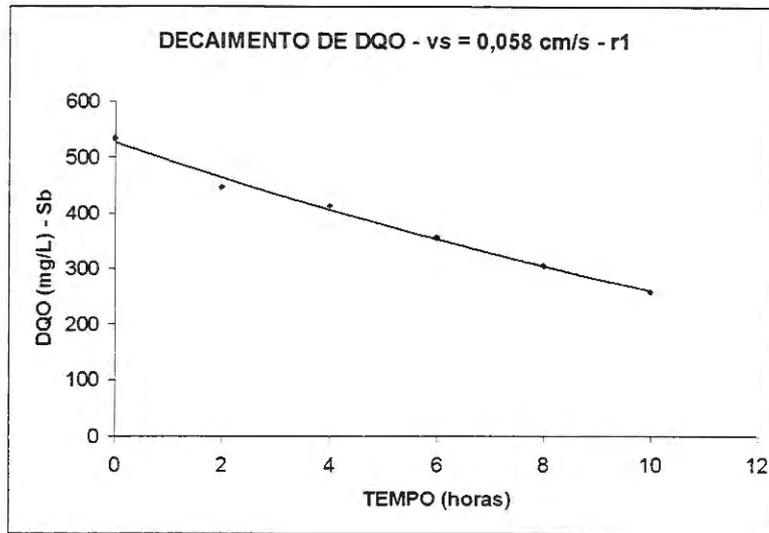


Figura 5.15: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,058 cm/s (•) e expressão (5.9) ajustada (—).

$$S_b = 0,5536t^2 - 32,164t + 525,86 \quad (5.9)$$

$$R^2 = 0,9918$$

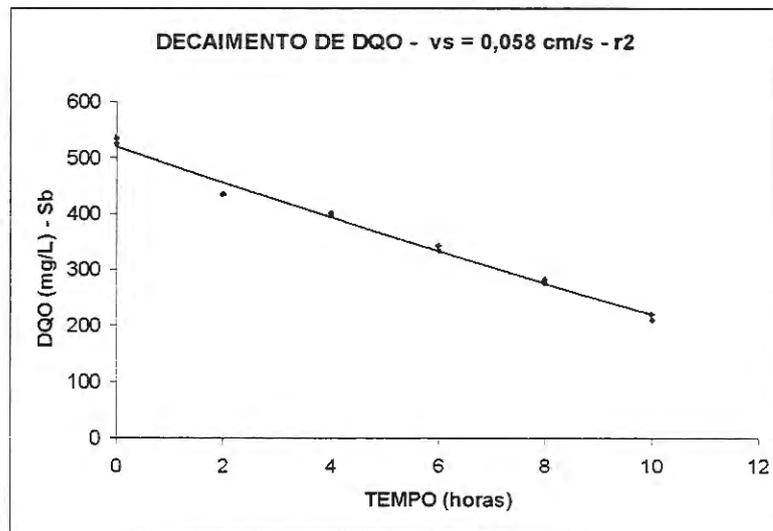


Figura 5.16: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,058 cm/s (•) e expressão (5.10) ajustada (—).

$$S_b = 0,2813t^2 - 32,813t + 519,75 \quad (5.10)$$

$$R^2 = 0,9887$$

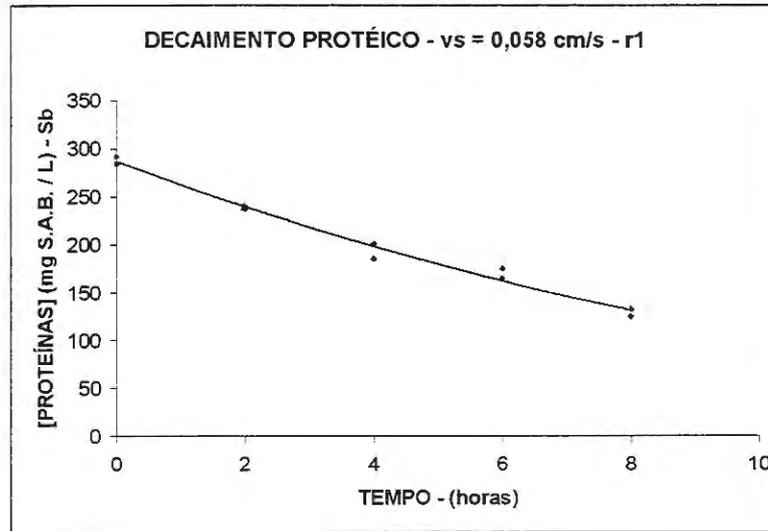


Figura 5.17: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,058 cm/s (●) e expressão (5.11) ajustada (—).

$$Sb = 0,7002t^2 - 24,872t + 286,5 \tag{5.11}$$

$$R^2 = 0,9859$$

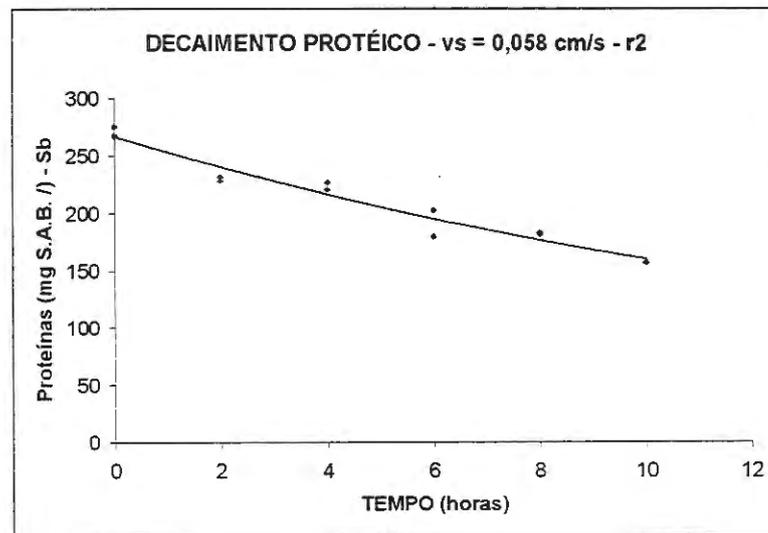


Figura 5.18: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,058 cm/s (●) e expressão (5.12) ajustada (—).

$$Sb = 0,3343t^2 - 14,05t + 266,87 \tag{5.12}$$

$$R^2 = 0,9525$$

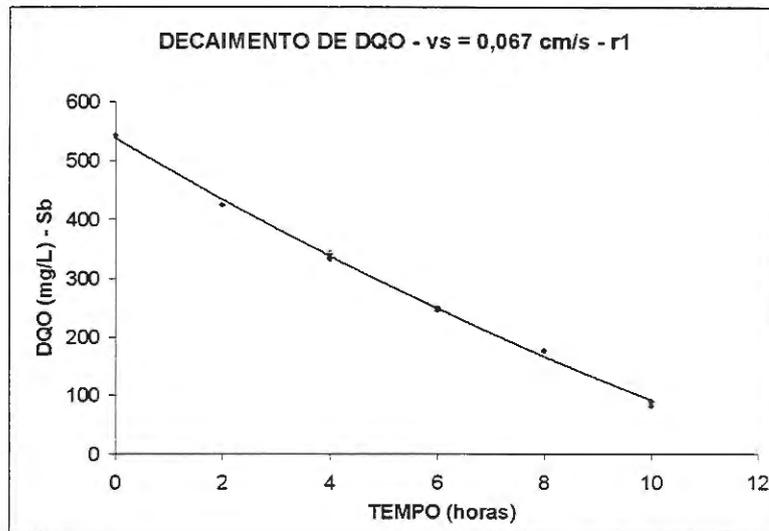


Figura 5.19: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,067 cm/s (•) e expressão (5.13) ajustada (—).

$$S_b = 0,9196t^2 - 53,818t + 537,79 \quad (5.13)$$

$$R^2 = 0,9981$$

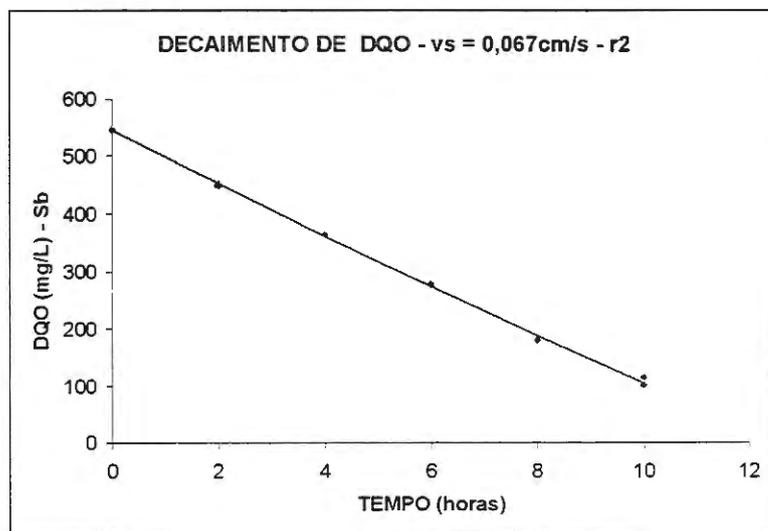


Figura 5.20: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,067 cm/s (•) e expressão (5.14) ajustada (—).

$$S_b = 0,2723t^2 - 46,78t + 545,25 \quad (5.14)$$

$$R^2 = 0,9988$$

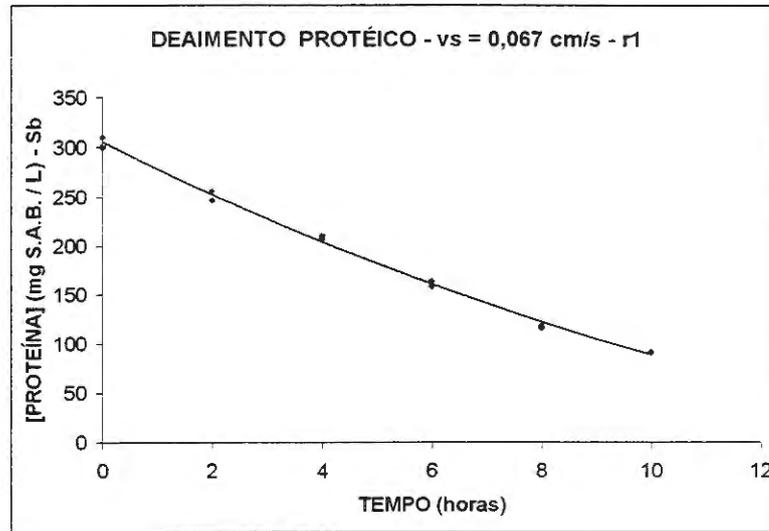


Figura 5.21: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,067 cm/s (●) e expressão (5.15) ajustada (—).

$$S_b = 0,6116t^2 - 27,868t + 305,74 \quad (5.15)$$

$$R^2 = 0,9966$$

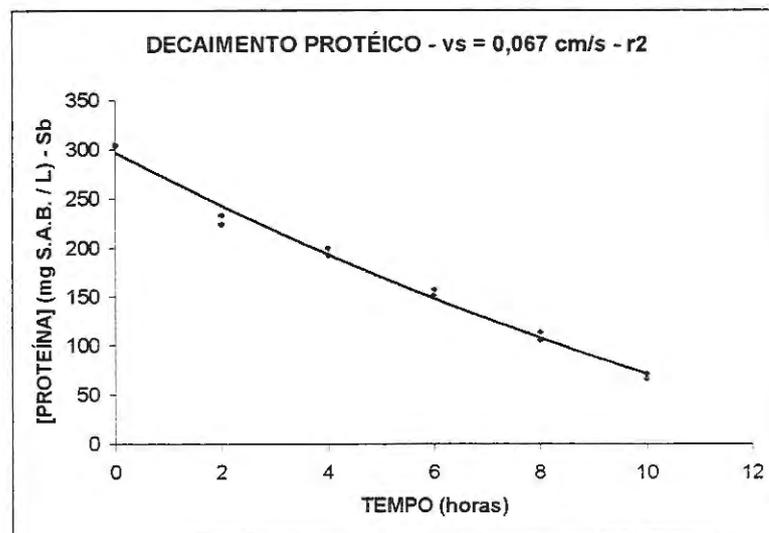


Figura 5.22: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,067 cm/s (●) e expressão (5.16) ajustada (—).

$$S_b = 0,5685t^2 - 28,169t + 296,66 \quad (5.16)$$

$$R^2 = 0,9892$$

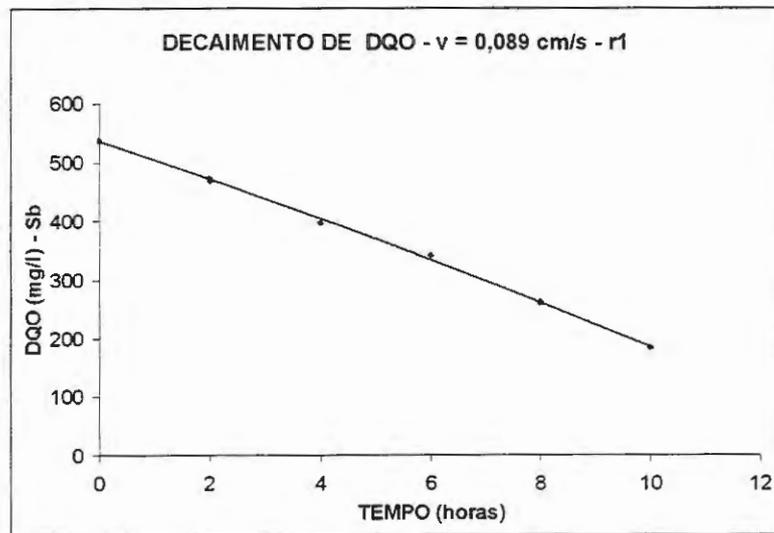


Figura 5.23: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,089 cm/s (●) e expressão (5.17) ajustada (—).

$$S_b = -0,3504t^2 - 31,546t + 536,16 \quad (5.17)$$

$$R^2 = 0,9984$$

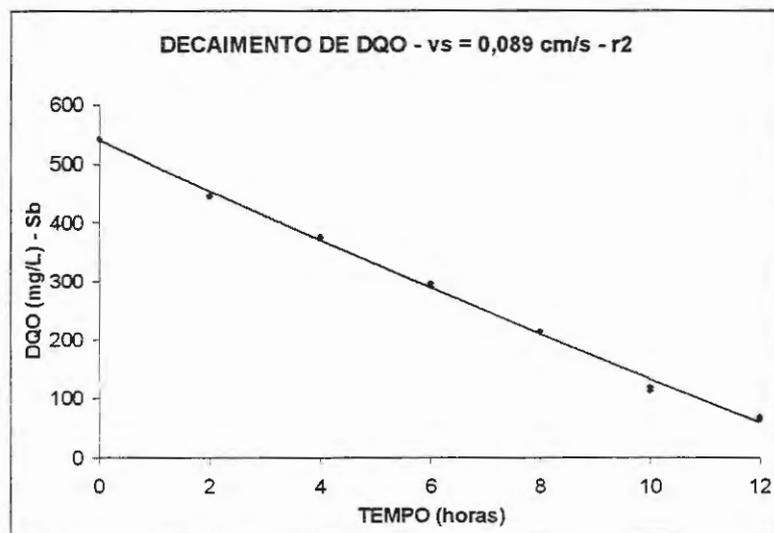


Figura 5.24: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,089 cm/s (●) e expressão (5.18) ajustada (—).

$$S_b = 0,2946t^2 - 43,607t + 539,61 \quad (5.18)$$

$$R^2 = 0,9973$$

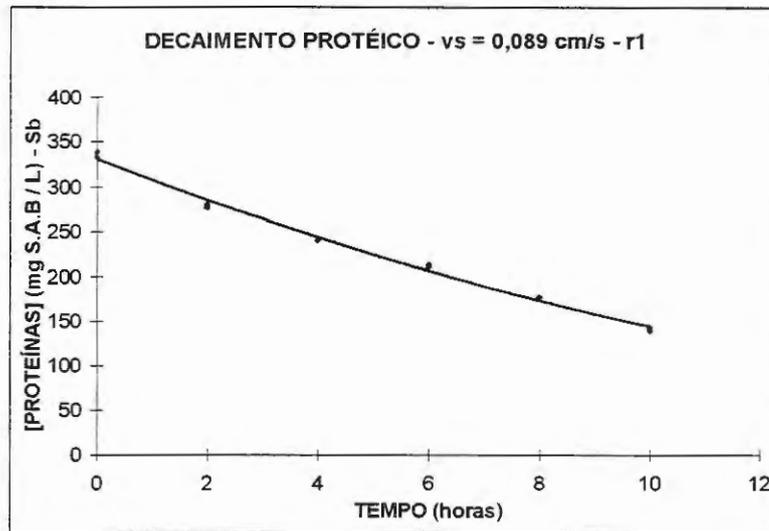


Figura 5.25: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,089 cm/s (●) e expressão (5.19) ajustada (—).

$$S_b = 0,545t^2 - 24,17t + 331,6 \tag{5.19}$$

$$R^2 = 0,9944$$

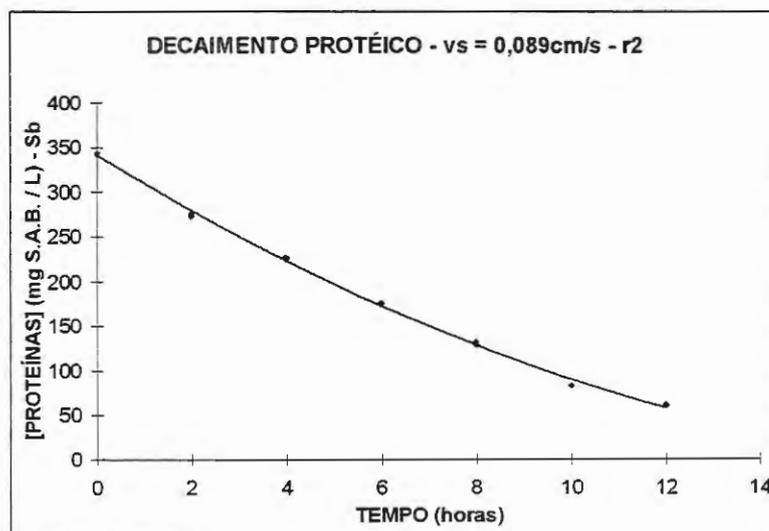


Figura 5.26: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,089 cm/s (●) e expressão (5.20) ajustada (—).

$$S_b = 0,7366t^2 - 32,53t + 341,59 \tag{5.20}$$

$$R^2 = 0,9982$$

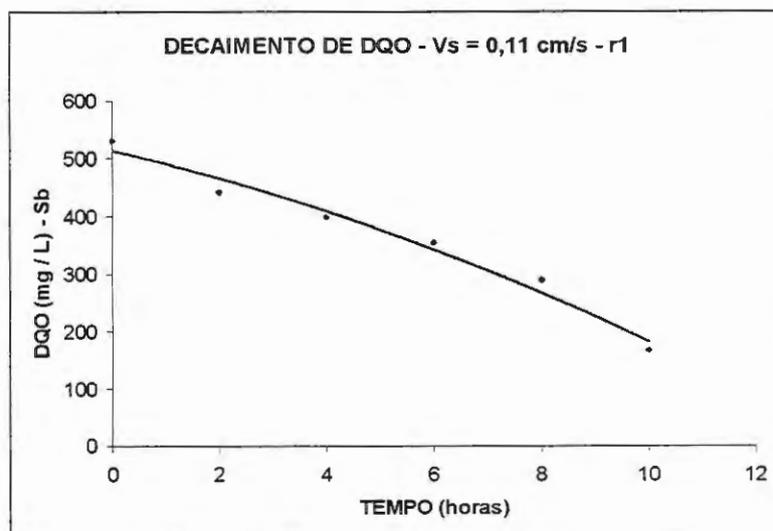


Figura 5.27: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,11 cm/s (•) e expressão (5.21) ajustada (—).

$$S_b = -1,1585t^2 - 21,508t + 513,77 \quad (5.21)$$

$$R^2 = 0,9762$$

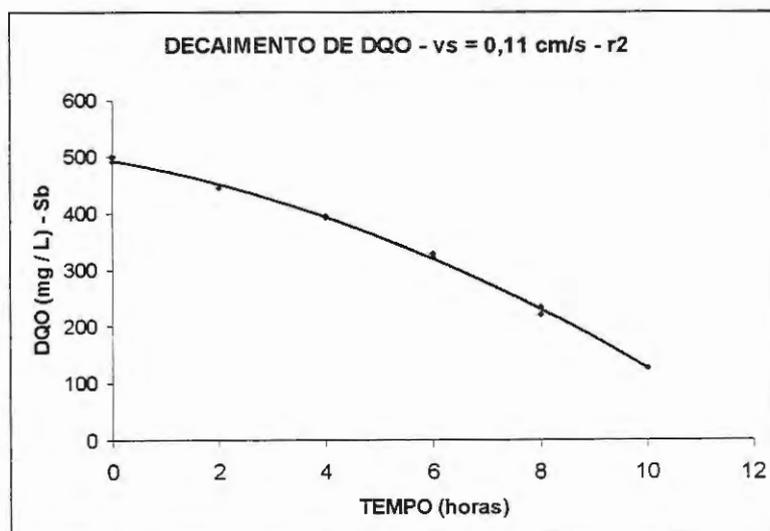


Figura 5.28: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,11 cm/s (•) e expressão (5.22) ajustada (—).

$$S_b = -1,9754t^2 - 16,967t + 493,02 \quad (5.22)$$

$$R^2 = 0,9983$$

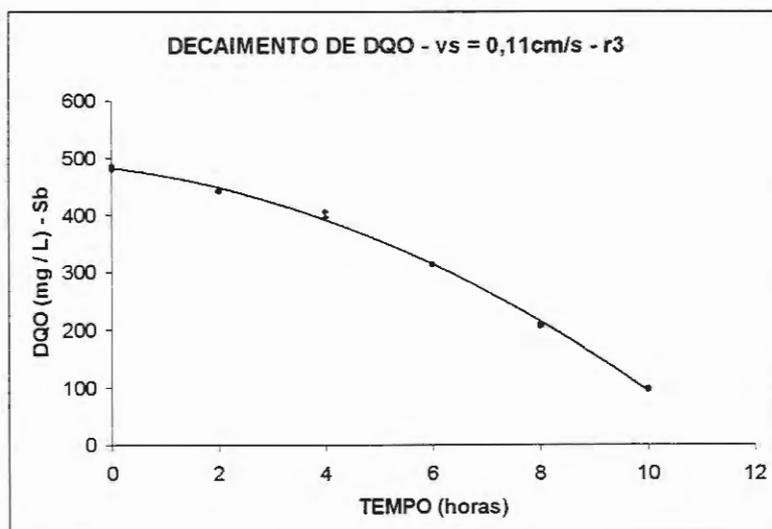


Figura 5.29: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,11 cm/s (•) e expressão (5.23) ajustada (—).

$$Sb = - 2,689t^2 - 11,996t + 482,02 \quad (5.23)$$

$$R^2 = 0,9979$$

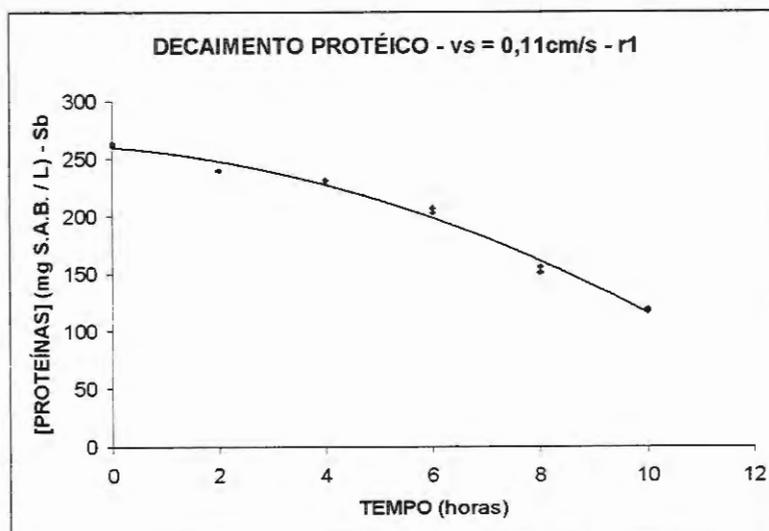


Figura 5.30: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,11 cm/s (•) e expressão (5.24) ajustada (—).

$$Sb = - 1,0454t^2 - 3,9568t + 259,68 \quad (5.24)$$

$$R^2 = -0,9865$$

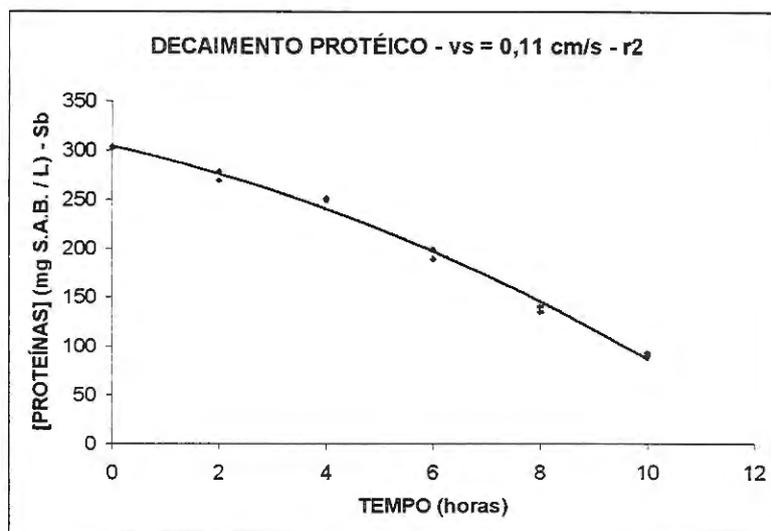


Figura 5.31: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,11 cm/s (•) e expressão (5.25) ajustada (—).

$$Sb = -0,9784t^2 - 11,954t + 304,09 \quad (5.25)$$

$$R^2 = -0,9924$$

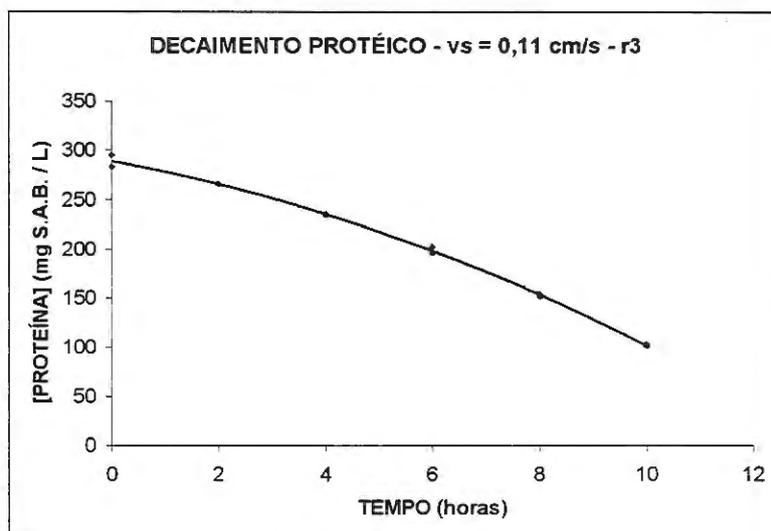


Figura 5.32: Valores do conteúdo de Sb (expresso em DQO – mg / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,11 cm/s (•) e expressão (5.26) ajustada (—).

$$Sb = -0,9007t^2 - 9,7385t + 288,62 \quad (5.26)$$

$$R^2 = 0,998$$

A partir das derivadas em função do tempo das expressões 5.1 a 5.26, obtiveram-se os valores de velocidades iniciais de consumo de substrato, que podem ser observados nas tabelas 5.3 e 5.4, para  $S_b$  expresso em DQO (mg/L) e concentração total de proteínas (mg S.A.B/L), respectivamente.

Tabela 5.3. Valores de velocidades iniciais ( $R_{obs|t=0}$ ) de consumo de substrato expresso em DQO (mg / L) para as diferentes velocidades superficiais aplicadas ao RHALFd

$V_s$ (cm/s)	$R_{obs t=0}$ (mg DQO/ L . h) - r1	$R_{obs t=0}$ (mg DQO/ L . h) - r2	$R_{obs t=0}$ (mg DQO/ L . h) - r3
0,023	45,4	51,1	--
0,045	23,6	27,2	--
0,058	32,2	32,8	--
0,067	53,8	46,8	--
0,088	31,5	43,6	--
0,11	21,5	17,0	12,0

Tabela 5.4. Valores de  $R_{obs|t=0}$  de consumo de substrato expresso em Quantidade total de proteínas (mg S.A.B. / L) para as diferentes velocidades superficiais aplicadas ao RHALFd

$V_s$ (cm/s)	$R_{obs t=0}$ (mg S.A.B./ L . h) - r1	$R_{obs t=0}$ (mg S.A.B./ L . h) - r2	$R_{obs t=0}$ (mg S.A.B./ L . h) - r3
0,023	20,4	22,3	--
0,045	23,7	25,2	--
0,058	24,9	14,1	--
0,067	27,9	28,2	--
0,088	24,2	32,5	--
0,11	4,0	12,0	9,7

Os valores de  $R_{obs|t=0}$  (r2) maiores que  $R_{obs|t=0}$  (r1) mostram que houve a ocorrência de adaptação do sistema a cada  $v_s$  aplicada. Portanto, para a continuidade dos cálculos, decidiu-se pela exclusão dos valores de  $R_{obs|t=0}$  (r1). Exceção a tal fato

ocorreu para as  $v_s$  com valores de 0.58 cm/s (Sb expresso em quantidade total de proteínas). Neste caso, foi detectada a presença de valores de pH inadmissíveis à degradação protéica logo no início do experimento, fato esse que influenciou negativamente o valor de velocidade inicial de consumo de substrato, deixando clara a necessidade de exclusão de tal ponto experimental para a continuidade dos cálculos de parâmetros cinéticos. O valores de  $R_{obs|t=0}$  provenientes de curvas de ajuste cujos primeiros termos (ligados a 2ª potência) possuem sinal negativo (5.5, 54.6, 5.17, 5.21 – 5.26) foram também excluídos para efeito de cálculos pois tal fato representa a ocorrência de processo adaptativo. As figuras 5.33 e 5.34 demonstram o comportamento de  $R_{obs|t=0}$  em função de  $v_s$ .

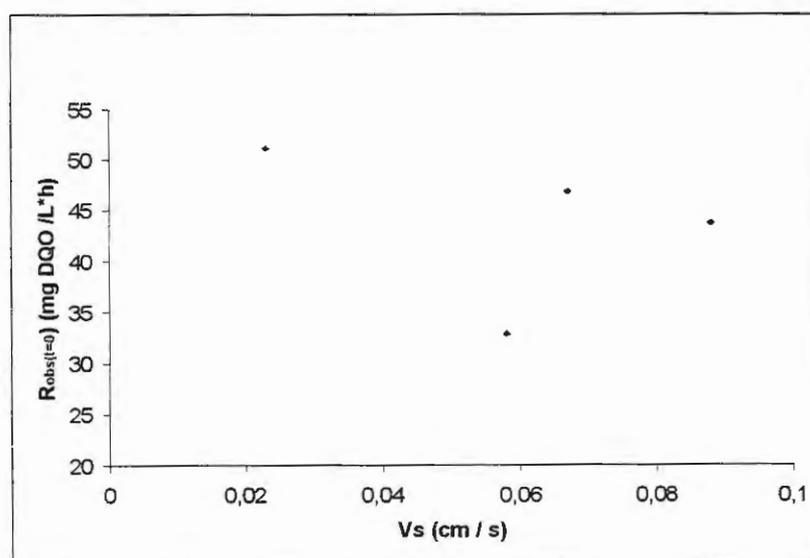


Fig. 5.33 Valores de  $R_{obs|t=0}$  de consumo de substrato (Sb expresso em DQO) em função do aumento dos valores  $v_s$  aplicados ao RHALFd ao longo do experimento.

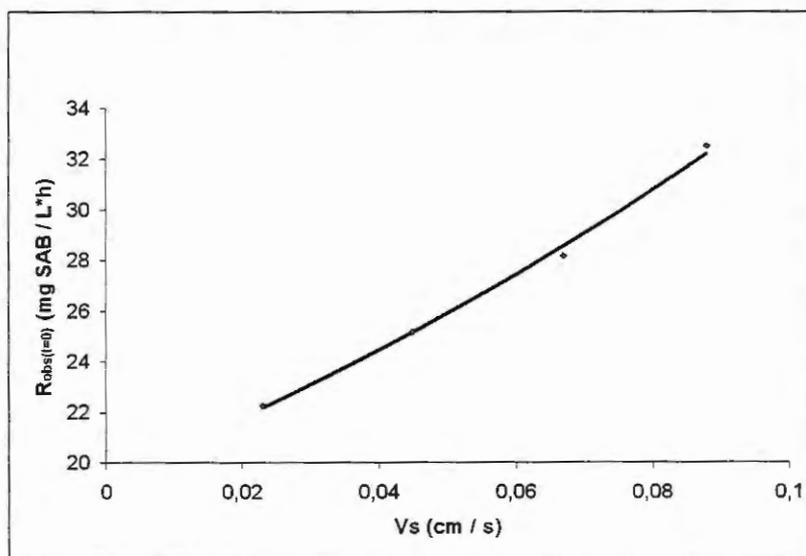


Fig. 5.34 Valores de  $R_{obs|t=0}$  de consumo de substrato (Sb expresso em quantidade total de proteína) em função do aumento dos valores  $v_s$  aplicados ao RHALFd ao longo do experimento (●) e expressão (5.27) ajustada (—).

$$R_{obs|t=0} = 19,433 e^{5,7491 v_s} \quad (5.27)$$

$$R^2 = 0,9962$$

Pode-se observar nas Figuras 5.33 e 5.34 que os valores de  $R_{obs|t=0}$  em função de  $v_s$  diferem em relação ao parâmetro de análise utilizado. Enquanto para Sb expresso em DQO, não é possível relacionar os valores de  $R_{obs|t=0}$  e  $v_s$ , para Sb expresso em quantidade total de proteínas, pode-se relacionar os citados valores de acordo com a expressão 5.27, uma curva exponencial assim como observaram ZAIAT (1997) e SARTI (1998), com excelente coeficiente de correlação. É importante ressaltar que possivelmente, devido aos baixos valores das velocidades superficiais utilizados neste experimento, a tendência demonstrada na figura 5.34, deve representar o início de uma curva, que para valores mais elevados de  $v_s$  pode modificar seu comportamento; portanto recomenda-se que a correlação 5.27 seja utilizada para a estimativa de  $R_{obs|t=0}$ , somente para a faixa de  $v_s$  utilizada nesse experimento..

A impossibilidade de obtenção de relação entre  $R_{obs|t=0}$  e  $v_s$  quando Sb é expresso em função da DQO deve-se, provavelmente, à complexidade das moléculas de proteína. Ao longo de sua degradação anaeróbia, a molécula protéica é inicialmente hidrolisada a peptídeos e aminoácidos, sendo tal processo citado em

literatura como o limitante do processo completo. Posteriormente ocorre a conversão de tais compostos (ainda complexos) a ácidos voláteis, dando continuidade à metanogênese, como qualquer outro composto (SAYED, 1988). Dessa forma, ao longo do tempo, a diferença de compostos originados pela quebra da molécula protéica é muito grande quando comparada à hidrólise de compostos simples como a glicose, cujo processo hidrolítico é rápido e origina monômeros facilmente convertidos a ácidos voláteis.

Devido a complexidade do processo, portanto, decidiu-se por não utilizar os dados obtidos experimentalmente com Sb expresso em DQO para a determinação de parâmetros cinéticos da degradação anaeróbia de proteínas.

A Figura 5.34 demonstra que para a faixa de  $v_s$  estudada, a diminuição da resistência a transferência de massa, ocasionada pela diminuição da camada de líquido estagnada ao redor dos suportes, em função do aumento de  $v_s$  foi benéfica ao sistema, pois houve aumento os valores de  $R_{obs|t=0}$ . Resultado semelhante foi observado por ZAIAT (1996), estudando a degradação anaeróbia de glicose, e SARTI (1998) estudando a degradação de substrato sintético simulando esgoto sanitário. Entretanto, segundo ZAIAT (1996), a extrapolação desse resultado para valores superiores de  $v_s$  não é conveniente, pois a minimização da camada de líquido estagnada nem sempre resulta no aumento das velocidades de reação, uma vez que a camada líquida pode representar uma proteção para as células dentro das partículas se a fase líquida contiver inibidores, produtos tóxicos ou, simplesmente, altas concentrações de substrato ou produtos intermediários.

Na Figura 5.35 encontra-se ilustrado o comportamento dos valores das cargas orgânicas aplicadas em função das taxas iniciais de consumo de substrato ( $R_{obs|t=0}$ ). Mais uma vez, é possível observar o efeito da minimização da resistência à transferência de massa, já que os valores de  $R_{obs|t=0}$  aumentam em função do aumento da carga orgânica. Os valores de carga orgânica utilizados nesse trabalho são 2,5 vezes maiores que os citados por Van HAANDEL & LETTINGA (1994) para filtro biológico (com brita nº 4 como material suporte) com mesmo tempo de residência que o utilizado neste trabalho, e apesar disso, o processo apresentou, ao longo de todas as cargas aplicadas, elevados níveis de eficiência.

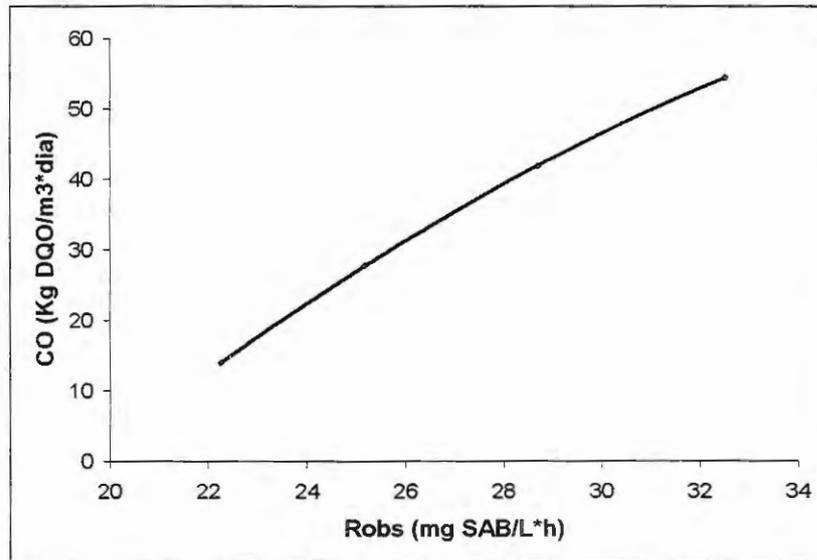


Fig. 5.35: Valores de carga orgânica aplicada ao RHALFd ao longo do experimento em função dos valores de  $R_{obs|t=0}$  de consumo de substrato ( $S_b$  expresso em quantidade total de proteína) (●) e expressão (5.28) ajustada (—).

$$C.O. = -0,1017 (R_{obs|t=0})^2 + 9,5075 (R_{obs|t=0}) - 147,27 \quad (5.28)$$

$$R^2 = 1$$

Ao final do experimento quantificou-se o teor de sólidos voláteis no sistema, com intuito de cálculo das velocidades específicas de consumo de substrato como realizado por ZAIAT (1996), VIEIRA et al. (1996) e VIEIRA (1997). Todavia, observou-se, sob exame de microscopia eletrônica de varredura e a olho nu (material gelatinoso aderido à biomassa), a presença de grande quantidade de polímeros extracelulares, por causa disso, optou-se pelo cálculo da velocidade específica em função do volume de suporte presente no sistema  $V_p = 9,5$  mL, originando os valores presentes na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Velocidades iniciais específicas de consumo de substrato para Sb expresso em quantidade total de proteínas ( $r_{obs|t=0}$ ) em função das  $v_s$  aplicadas ao longo do experimento no sistema com um volume líquido 0,5 L.

$v_s$ (cm / s)	$r_{obs t=0}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)
0,023	1,2
0,045	1,3
0,067	1,5
0,088	1,7

As derivadas em função do tempo das expressões 5.4, 5.8, 5.16 e 5.20 aplicadas para cada valor de Sb obtido durante o experimento permitiu o cálculo das velocidades globais de reação e velocidades específicas de reação para cada valor de  $v_s$  aplicado no RHALFd. Tais valores são apresentados nas tabelas 5.6 a 5.9.

Tabela 5.6: Valores de  $R_{obs}$  e  $r_{obs}$  em função da concentração  $S_b$  para a  $v_s$  de 0,023 cm / s

$S_b$ (mg S. A. B. / L)	$R_{obs}$ (mg S. A. B. / L . h)	$r_{obs}$ (mg S. A. B. / . mL . suporte . h)
292	22,3	1,2
244	21,0	1,1
214	19,8	1,0
171	18,5	1,0
124	17,2	0,9
104	16,0	0,8

Tabela 5.7: Valores de  $R_{obs}$  e  $r_{obs}$  em função da concentração  $S_b$  para a  $v_s$  de 0,045 cm / s

$S_b$ (mg S. A. B. / L)	$R_{obs}$ (mg S. A. B. / L . h)	$r_{obs}$ (mg S. A. B. / . mL . suporte . h)
328	25,2	1,3
269	23,6	1,2
232	21,9	1,2
189	20,3	1,1
151	18,7	1,0
111	17,1	0,9

Tabela 5.8: Valores de  $R_{obs}$  e  $r_{obs}$  em função da concentração  $S_b$  para a  $v_s$  de 0,067 cm / s

$S_b$ (mg S. A. B. / L)	$R_{obs}$ (mg S. A. B. / L . h)	$r_{obs}$ (mg S. A. B. / . mL . suporte . h)
304	28,2	1,6
228	25,9	1,4
196	23,6	1,3
154	21,4	1,2
109	19,1	1,1
69	16,8	0,9

Tabela 5.9: Valores de  $R_{obs}$  e  $r_{obs}$  em função da concentração  $S_b$  para a  $v_s$  de 0,088 cm / s

$S_b$ (mg S. A. B. / L)	$R_{obs}$ (mg S. A. B. / L . h)	$r_{obs}$ (mg S. A. B. / . mL . suporte . h)
343	32,5	1,8
274	29,6	1,7
226	26,6	1,5
176	23,7	1,3
130	20,7	1,12
83	17,8	1,0

A partir dos valores de  $r_{obs}$  em função de  $S_b$  presentes nas Tabelas 5.6 a 5.9 pôde-se calcular o valor dos parâmetros cinéticos aparente da equação de Monod ( $r_{máx}^{app}$  e  $K_s^{app}$ ). Para tanto, utilizaram--se três métodos de ajuste diferentes, a fim de se obter os melhores coeficientes de correlação ( $R^2$ ). Os métodos utilizados foram: linearização de Line-Weaver Burk, linearização de Hannes-Wolf e ajuste direto pela equação de Monod. As linearizações foram realizadas utilizando-se o programa computacional Excel versão 7.0, enquanto que o ajuste pela equação de Monod foi realizado com auxílio do programa computacional Origin versão 4.0. Os resultados dos parâmetros cinéticos aparentes para cada valor de  $v_s$  aplicado e os respectivos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) encontram-se nas tabelas 5.10 a 5.12.

A título de comparação realizou-se também ajuste para cinética de primeira ordem, utilizando-se o programa computacional Excel versão 7.0 a partir da equação 4.11. Os resultados desse ajuste encontram-se na tabela 5.13.

Tabela 5.10 Parâmetros cinéticos aparentes da expressão cinética tipo Monod em função de  $v_s$  e coeficientes de correlação para o ajuste não linear da equação de Monod

$V_s$ (cm/s)	$r_{máx}^{app}$ (mg SAB/mL suporte . L)	$K_s$ (mg SAB/L)	$R^2$
0,023	2,9	78	0,97093
0,045	3,5	114	0,97591
0,067	3,9	87	0,94669
0,089	5,0	145	0,96810

Tabela 5.11 Parâmetros cinéticos aparentes da expressão cinética tipo Monod em função de  $v_s$  e coeficientes de correlação para a linearização de Line- Weavers Burk

$V_s$ (cm/s)	$r_{máx}^{app}$ (mg SAB/mL suporte . L)	$K_s$ (mg SAB/L)	$R^2$
0,023	2,9	73	0,9764
0,045	3,4	101	0,9726
0,067	3,6	68	0,9416
0,089	4,5	111	0,9567

Tabela 5.12 Parâmetros cinéticos aparentes da expressão cinética tipo Monod em função de  $v_s$  e coeficientes de correlação para a linearização de Hanes-Woolf

$V_s$ (cm/s)	$r_{\text{máx}}^{\text{app}}$ (mg SAB/mL suporte . L)	$K_s$ (mg SAB/L)	$R^2$
0,023	3,0	82	0,9934
0,045	3,6	118	0,9923
0,067	4,0	93	0,9836
0,089	5,0	148	0,9809

Tabela 5.13. Parâmetros cinéticos ( $k_1^{\text{app}}$ ) aparentes de expressão cinética tipo primeira ordem para consumo de substrato em função de  $v_s$ , e coeficientes de correlação.

$V_s$ (cm/s)	$K_1^{\text{app}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$R^2$
0,023	0,11	0,9806
0,045	0,11	0,9674
0,067	0,14	0,98
0,089	0,15	0,98

Pode-se observar nos dados apresentados nas tabelas 5.10 a 5.12 que os melhores coeficientes de correlação obtidos foram os provenientes da linearização de Hanes – Woolf, sendo que os valores de  $r_{\text{máx}}^{\text{app}}$  obtidos por esse método se assemelharam muito aos obtidos pelo ajuste direto da equação de Monod, o que já não ocorre com os valores obtidos pela linearização de Line-Weaver Burk, cujos valores de coeficiente de correlação foram os de menor qualidade encontrados dentre os ajustes à cinética semelhante a reação de Monod

Pode-se notar na Tabela 5.13 que os valores de  $k_1$  aumentam, o que confirma o efeito da diminuição da resistência à transferência de massa, no caso de um ajuste para um modelo cinético de primeira ordem. Os valores dos coeficientes de correlação encontrados quando se ajustam os dados experimentais para cinética de primeira ordem são melhores que os valores obtidos para os ajuste linear de Line-Weaver Burk e não linear da equação semelhante a Monod, porém são piores que os valores obtidos para a linearização de Hanes-Woolf. Dessa forma, para a

continuidade dos cálculos foram utilizados os parâmetros obtidos pela linearização de Hannes-Wolf, assim como ZAIAT (1996).

Os valores de  $r_{\text{máx}}^{\text{app}}$  sofreram aumento à medida em que aumentou-se a velocidade superficial aplicada ao sistema, enquanto os valores de  $K_s^{\text{app}}$  não apresentaram comportamento definido. O aumento dos valores de  $r_{\text{máx}}^{\text{app}}$  é mais uma prova de que o aumento dos valores de  $V_s$  foram benéficos para o processo, já que realmente minimizaram a espessura da camada estagnada ao redor do suporte, diminuindo, dessa maneira, o efeito da resistência a transferência de massa e aumentando, com isso, a disponibilidade de substrato aos microrganismos.

Os valores de velocidades específicas de utilização de substrato observadas e os previstos pelo modelo cinético de Monod ( $r_{\text{obs}}^{\text{teor}}$ ) para cada  $v_s$  encontram-se nas tabelas 5.14 a 5.17 assim como os respectivos erros calculados segundo a expressão 5.28.

$$\text{ERRO} = [ (r_{\text{obs}} - r_{\text{obs}}^{\text{teor}}) / r_{\text{obs}} ] \cdot 100 \quad (5.28)$$

Tabela 5.14: Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{\text{obs}}^{\text{teor}}$ ) para  $v_s =$  de 0,023 cm/s

Sb (mg S.A.B. / L)	$r_{\text{obs}}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	$r_{\text{obs}}^{\text{teor}}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	ERRO (%)
292	1,2	1,2	1,70
244	1,1	1,1	0,62
214	1,0	1,1	-2,40
171	1,0	1,0	-1,63
124	0,9	0,9	2,5
104	0,8	0,8	1,87

Tabela 5.15: Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{obs}^{teor}$ ) para  $v_s =$  de 0,045 cm/s

Sb (mg S.A.B. / L)	$r_{obs}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	$r_{obs}^{teor}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	ERRO (%)
328	1,3	1,3	1,72
269	1,2	1,2	0,42
232	1,2	1,2	-1,53
189	1,1	1,1	-2,22
151	1,0	1,0	-0,73
111	0,9	0,9	4,34

Tabela 5.16: Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{obs}^{teor}$ ) para  $v_s =$  de 0,067 cm/s

Sb (mg S.A.B. / L)	$r_{obs}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	$r_{obs}^{teor}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	ERRO (%)
304	1,6	1,5	2,29
228	1,4	1,4	1,21
196	1,3	1,4	-3,63
154	1,2	1,3	-4,96
109	1,1	1,1	-1,98
68	0,9	0,9	9,47

Tabela 5.17: Velocidades específicas de utilização de substrato observadas experimentais e previstas pelo modelo de Monod ( $r_{obs}^{teor}$ ) para  $v_s =$  de 0,089 cm/s

Sb (mg S. A. B. / L)	$r_{obs}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	$r_{obs}^{teor}$ (mg S. A. B. / mL . suporte . h)	ERRO (%)
343	1,8	1,8	2,67
274	1,7	1,6	0,71
226	1,5	1,5	-2,98
176	1,3	1,4	-3,70
130	1,2	1,2	-2,68
83	1,0	0,9	8,62

Os coeficientes volumétricos de transferência de massa na fase líquida ( $k_{sa}$ ) foram estimados segundo a expressão 4.4 obtida por ZAIAT (1996). Em relação ao fato da variação de tal parâmetro com propriedades como a viscosidade e densidade, após a estimativa dessas propriedades físicas em várias águas residuárias, ZAIAT (1996) concluiu que as viscosidades eram iguais à da água e as densidades semelhantes e, portanto, tal expressão pode ser utilizada para a estimativa dos valores de  $k_{sa}$  em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo contendo lodo anaeróbio imobilizado em espumas de poliuretano com raio de esfera equivalente de 0,31 cm e porosidade de leito ( $\epsilon$ ) de 0,4. Segundo o autor, a expressão citada só é válida com segurança para faixa de  $v_s$  por ele aplicada (0,007 – 0,075), semelhante à utilizada neste experimento. Os valores de  $k_{sa}$  encontrados neste experimento são apresentados na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 Valores de  $k_{sa}$  para os diferentes valores de  $v_s$  aplicados ao longo do experimento

$v_s$ (cm/s)	$k_{sa}$ ( $h^{-1}$ ) . $10^2$
0,023	3,84
0,045	4,98
0,067	6,17
0,088	7,34

Para o cálculo do coeficiente de transferência de massa na fase líquida ( $K_s$ ), calculou-se o valor da área interfacial de transferência de massa ( $a$ ) cujo valor foi  $6,44 \text{ cm}^{-1}$ , de acordo com a expressão 4.6. Os valores de  $K_s$  foram então calculados e encontram-se na Tabela 5.19 para os diferentes valores de  $v_s$  utilizados ao longo do experimento, juntamente com os respectivos valores do número de Biot ( $Bi$ ) calculados segundo a expressão 4.7. O valor da difusividade efetiva utilizado para o cálculo do número de Biot, foi estimado de acordo com WILLIAMSON & McCARTY apud DROSTE & KENNEDY (1986) como sendo 80% do valor da difusividade no meio aquoso de  $2,01 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot h^{-1}$ , estimada pela correlação 4.8 (PERRY & CHILTON, 1985) para a massa molecular da molécula de gelatina (36400 Daltons) determinada por GABR & MICHAEL apud REYNOLDS (1982).

Tabela 5.19 Valores de  $k_s$  e Bi para os diferentes valores de  $v_s$  aplicados ao longo do experimento

$v_s$ (cm/s)	$k_s$ ( $h^{-1}$ ) $\cdot 10^2$	Bi
0,023	0,2513	0,39
0,045	0,3258	0,50
0,067	0,4035	0,62
0,089	0,4838	0,74

Como pode-se observar na Tabela 5.19 os valores de Biot são menores que 100, o que indica, segundo BAILEY & OLLIS (1986), que a resistência à transferência de massa na fase líquida é o fator limitante do processo. Este fato é comprovado nesse experimento pelos dados presentes na Tabela 5.4 e pela Figura 5.34 que demonstram o aumento dos valores das velocidades iniciais de consumo de substrato ( $R_{obs}|_{t=0}$ ) com o aumento dos valores das velocidades superficiais aplicadas. Este resultado comprova, mais uma vez, como valores mais elevados de  $v_s$  são benéficos ao sistema uma vez que provocam o aumento das velocidades reacionais.

Através dos parâmetros cinéticos aparentes estimados presentes na tabela 5.12, pôde-se aplicar o método de extrapolação gráfica desenvolvida por ZAIAT (1996) para estimativa de parâmetros cinéticos intrínsecos.

Os parâmetros cinéticos aparentes estimados foram então utilizados na expressão de Monod (4.9) para que fossem gerados valores de  $r_{obs}$  em função de  $S_b$ , variando de 60 a 360, para cada valor de Bi presente na Tabela 5.19, e são apresentados na Tabela 5.20.

Tabela 5.20: Velocidades específicas de utilização de substrato observadas ( $r_{obs}$ ) em mg S.A.B. / ml de suporte . h estimadas pela expressão cinética de Monod em função de diferentes concentrações de substrato na fase líquida para os diferentes valores dos coeficientes de transferência de massa ( $k_s$ )

Bi	Sb(mg S. A. B. / L)					
	360	300	240	180	120	60
0,3888	2,44123	2,3353556	2,233251	2,057927	1,778656	1,264045
0,5040	2,708011	2,580152	2,409504	2,170273	1,810713	1,209542
0,6238	3,176354	3,050718	2,879856	2,633986	2,249824	1,565047
0,7427	3,545331	3,350383	3,095097	2,746331	2,241231	1,444321

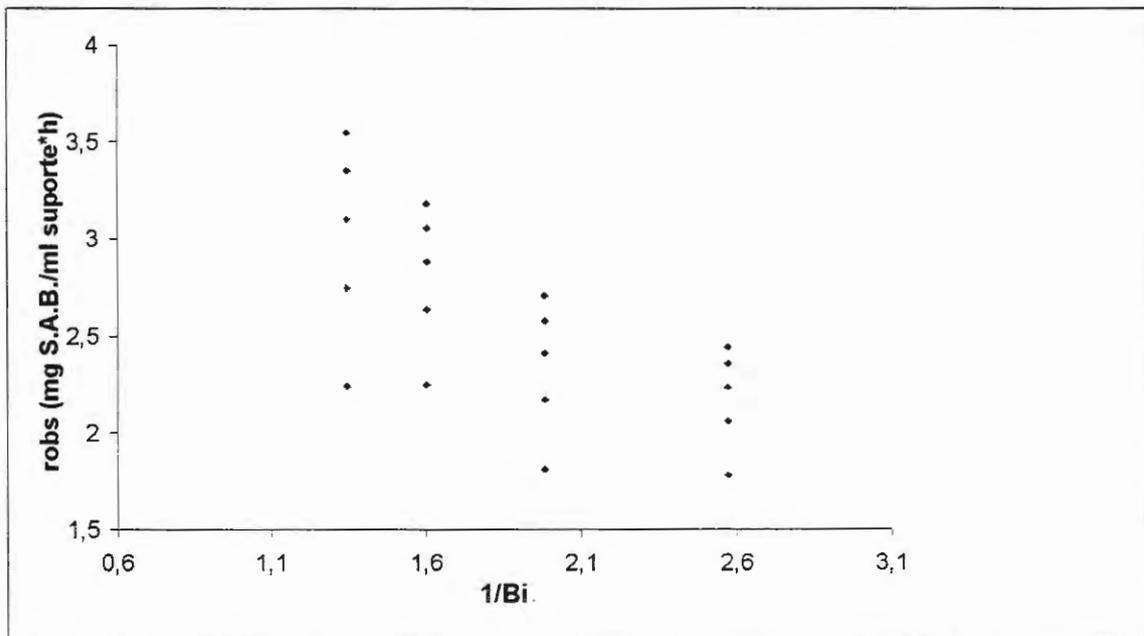


Figura 5.36: Perfis de decréscimo de  $r_{obs}$  gerados pela expressão de Monod em função do inverso do número de Biot

Com auxílio do programa computacional Excel, obtiveram-se as correlações de  $r_{obs}$  em função do inverso do número de Biot presentes na figura 5.36, e através de regressão polinomial de segunda ordem como (5.29) obtiveram-se os coeficientes,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que, assim como os coeficientes de correlação correspondentes a cada ajuste, encontram-se na Tabela 5.21

$$r_{\text{obs}} = \alpha + \beta (bi^{-1}) + \gamma (Bi^{-1})^2 \quad (5.29)$$

Tabela 5.21: Coeficientes das expressões ajustadas de correlação de  $r_{\text{obs}}$  e  $Bi^{-1}$  e respectivos coeficientes de correlação do ajuste ( $R^2$ )

Sb (mg S.A.B./ L)	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$R^2$
360	7,1092	-3,5436	0,6717	0,9989
300	6,6092	-3,2257	0,6099	0,9944
240	5,9743	-2,8318	0,534	0,9815
180	5,1434	-2,335	0,4393	0,9463
120	4,0151	-1,7003	0,3202	0,8438

O método utilizado visa a extrapolação gráfica para valores de  $Bi$  tão elevados que a resistência a Transferência de massa externa seria desprezível. Isso seria observado quando os valores do inverso do número de Biot tendessem a zero, ou seja quando os valores de  $r_{\text{obs}}$  são iguais aos do coeficiente  $\alpha$ , e então chamados de  $r_{\text{obs}}^*$ .

Com os valores de  $r_{\text{obs}}^*$  calculou-se então os valores do módulo de Thiele observado ( $\phi_{\text{obs}}$ ) afim de se verificar as condições de transferência de massa intraparticular, e os valores encontrados encontram-se na tabela 5.22

Tabela 5.22: Valores do módulo de Thiele observado para cada valor de  $r_{\text{obs}}^*$  gerado pela expressão de Monod.

Sb (mg S. A. B. L)	$r_{\text{obs}}^*$ (mg S. A. B. /ml suporte . h)	$\phi_{\text{obs}}$
360	7,1092	0,076
300	6,6092	0,113
240	5,9743	0,106
180	5,1434	0,107
120	4,0151	0,144

Como os valores de  $\phi_{\text{obs}}$  foram menores que 0,3, pode-se considerar que a limitação interna à transferência de massa é desprezível em relação à velocidade da reação bioquímica. Os valores de  $r^*_{\text{obs}}$  podem ser considerados como valores de velocidade de reação que seriam obtidos caso não houvesse resistência externa e interna à transferência de massa. Sendo assim, pôde-se estimar, a partir de linearização de Hanes-Woolf, os parâmetros cinéticos intrínsecos do modelo cinético tipo Monod, através dos valores de  $S_b$  e  $r^*_{\text{obs}}$  da tabela 5.22:

Todavia, é importante ressaltar que apesar dos excelentes coeficientes de correlação obtidos para a linearização de Hanes-Woolf, valores de  $K_s$  presentes na Tabela 5.12, não apresentam nenhuma tendência definida, o que pode indicar que o papel dessa variável nesta modelagem, seja de mero ajuste. Portanto, um modelo cinético do tipo Monod pode não representar corretamente o processo estudado, sendo talvez, mais prudente a utilização dos parâmetros cinéticos de primeira ordem, presentes na Tabela 5.13, para a modelagem da degradação anaeróbia de gelatina em reator de leito fixo, com espuma de poliuretano como recheio, na faixa de velocidade estudada.

## ***5.2. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE GELATINA (com lodo cultivado em RHALFd degradando substrato sintético a base de gelatina como principal fonte de carbono)***

Após o término do experimento de avaliação da microbiota presente ao longo da formação do biofilme, realizou-se um monitoramento, com duração de 10 horas, do comportamento da alcalinidade, do Nitrogênio amoniacal e do decréscimo da quantidade total de proteínas.

O perfil de decaimento protéico permitiu a estimativa dos parâmetros cinéticos aparentes da equação de Monod para a degradação anaeróbia de gelatina em leito fixo em espumas de poliuretano, com  $\varepsilon = 0,4$  e velocidade superficial aplicada de 0,043 cm/s

O comportamento da alcalinidade total e do nitrogênio amoniacal podem ser observados nas Figuras 5.37 e 5.38 respectivamente.

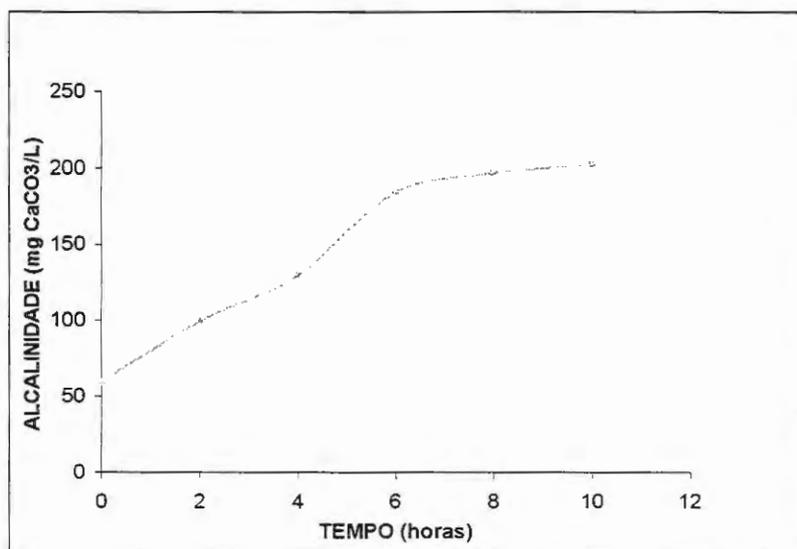


Figura 5.37: Valores de alcalinidade ao longo do tempo para lodo proteolítico cultivado em RHALFd

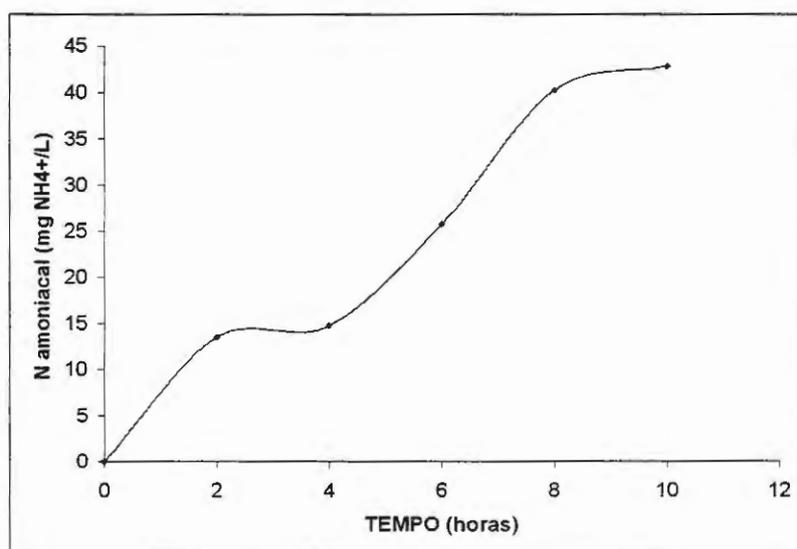


Figura 5.38: Valores do teor de nitrogênio amoniacal ao longo do tempo para lodo proteolítico cultivado em RHALFd

Os comportamentos observados nas figuras 5.37 e 5.38 se encontram de acordo com o esperado, já que segundo SAYED (1987) e McINERNEY (1988) a

degradação protéica por processo anaeróbio, implica na formação de amônia, e tal composto gera alcalinidade total.

Os níveis de nitrogênio amoniacal encontrados ao fim do período de 10 horas parecem não inibir a ação microbiana de degradação protéica, já que os organismos responderam da mesma forma durante 22 dias de operação do reator em processo semi-contínuo com TDH de 12 horas. PARKIN et al (1983), relataram a adaptação da microbiota metanogênica a valores superiores a 8000 mg / L.

Na Tabela 5.23 encontram-se os valores de Sb obtidos experimentalmente ao longo do tempo, que permitiram a obtenção do perfil de decaimento observado na Figura 5.39.

Através das expressões 5.30 (expressão ajustada) e 5.31 (derivada de Sb em função do tempo) pôde-se calcular o valor de  $R_{obs|t=0} = 28,96 \text{ mg S. A. B. / L. h}$  e  $r_{obs|t=0} = 1,52 \text{ mg S. A. B. / mL de suporte. h}$ , em relação a quantidade de suporte presente no sistema (9,5 mL).

Tabela 5.23 Concentração de substrato na fase líquida (Sb expresso em concentração total de proteínas) em função do tempo.

[PROTEÍNAS] ( mg S. A. B. / L)	TEMPO (horas)
2221	0
173	2
120	4
84	6
55	8
31	10
31	12

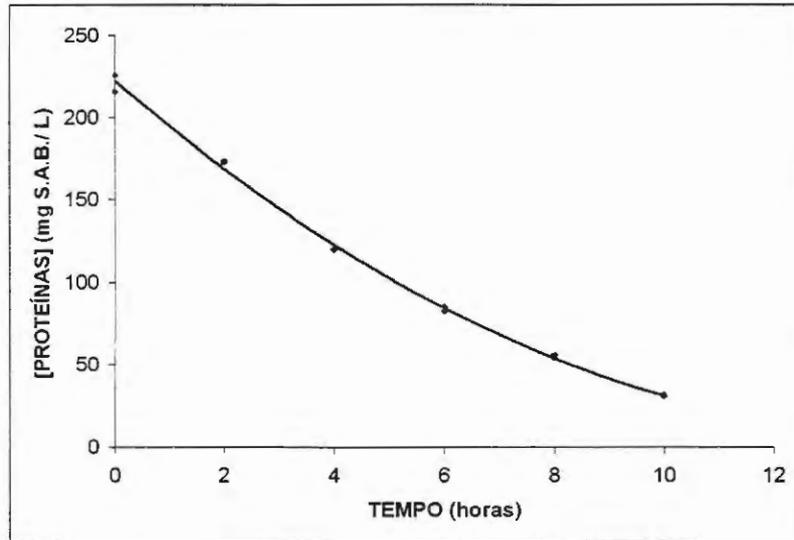


Figura 5.39: Valores do conteúdo de Sb (expresso em concentração de proteínas - mg S. A. B. / L) em função do tempo para  $v_s$  de 0,043 cm/s (•) e expressão (5.29) ajustada (—).

$$S_b = 0,9822t^2 - 28,9t + 222,66 \quad (5.30)$$

$$R^2 = 0,9977$$

$$S_b = 1,8644t + 28,96 \quad (5.31)$$

Os valores de  $r_{obs}$  foram correlacionados aos valores de  $S_b$  mensurados ao longo do experimento de acordo com a equação de Monod linearizada pelo método de Hanes-Woolf (Figura 5.40). A expressão ajustada 5.32, comparada à equação 4.10, possibilitou então, a estimativa de  $r_{máx}^{app} = 2,34$  mg SAB/mL suporte . h e  $K_s^{app} = 23$ mg SAB / L

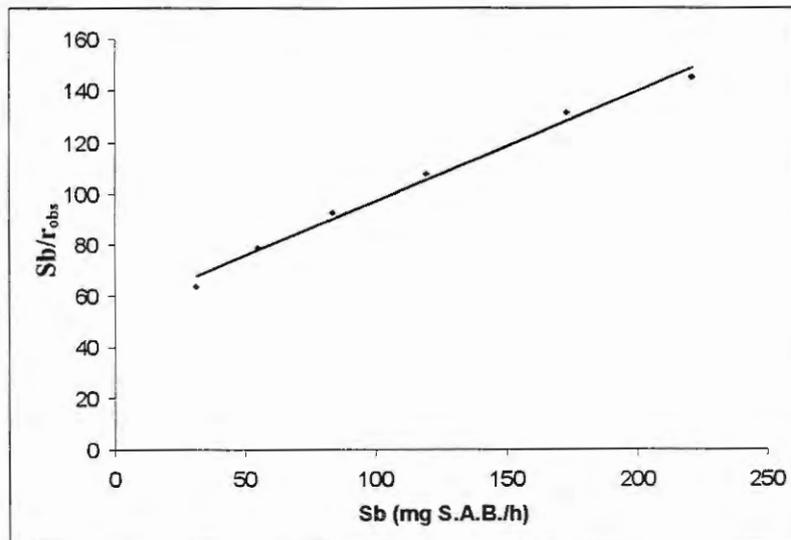


Figura 5.40 – Correlação de  $r_{obs}$  e  $S_b$  (•) e expressão ajustada (—).

$$S_b/r_{obs} = 0.4273.S_b + 54.472 \quad (5.32)$$

$$R^2 = 0.9892$$

O valor de  $r_{m\acute{a}x}^{app}$  estimado pela expressão 5.32 ( $v_s = 0,043$  cm/s) é ligeiramente inferior ao valor de  $r_{m\acute{a}x}^{app}$  estimado para a  $v_s = 0,045$  cm/s para lodo adaptado proveniente de RHALF tratando substrato sintético simulando esgoto sanitário; enquanto o valor de  $K_s$  do biofilme monitorado representa somente 19% do valor de  $K_s$  estimado para a biomassa já imobilizada.

Já que o valor da taxa de degradação de substrato possivelmente está sendo influenciado pela maior quantidade de sólidos presente na biomassa previamente imobilizada, pode-se inferir, que a formação de um biofilme específico para a degradação protéica leva a um processo mais eficiente do que um biofilme composto por microrganismos previamente arranjados e adaptados ao citado substrato.

O ajuste ao modelo cinético de primeira ordem, de acordo com a equação 4.11, permitiu a obtenção da constante  $k_1 = 0,19$  h<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9835$ . O valor de  $k_1$  encontrado para o biofilme proteolítico monitorado também é superior ao valor de  $k_1$  encontrado para o lodo proveniente do tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário, quando o reator foi submetido à mesma velocidade superficial. Tal fato confirma a hipótese de obtenção de melhores taxas de degradação de proteínas usando-se um lodo biológico desenvolvido especialmente para este processo.

### 5.3. EXAMES SOB MICROSCOPIA

#### 5.3.1. ENSAIO EXPLORATIVO

No início da fase experimental, realizou-se um ensaio explorativo com lodo previamente imobilizado em espumas de poliuretano proveniente de um Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo, utilizado por SARTI (1998) para tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário. Este ensaio teve por objetivo verificar a competência desses microrganismos na degradação anaeróbia de proteínas, assim como adaptá-los para a realização do ensaio cinético de determinação das constantes da equação de Monod para a utilização desse substrato.

O aparato experimental utilizado foi o mesmo desenvolvido por ZAIAT (1996), descrito previamente na Figura 4.1. Neste experimento, no entanto, não foram tomadas providências para a obtenção de anaerobiose no frasco de alimentação do sistema.

As eficiências de remoção de proteína atingiram aproximadamente 80% em 24 horas após 15 dias de operação, e como surgiram dúvidas acerca da presença de oxigênio no frasco de alimentação, assim como no líquido de veículo de substrato, decidiu-se pela desmontagem do sistema e posterior observação microscópica de contraste de fase das morfologias presentes no reator.

A Figura 5.41 mostra as morfologias predominantes que foram: organismos filamentosos (Figura 5.41 a), bacilos 1 (Figura 5.41 b), bacilos 2 (Figura 5.41 c), cocos (Figura 5.41 d), e bacilos curvos (Figura 5.41 e).

Pode-se dizer que essas observações facilitaram as fases subsequentes desse trabalho no que diz respeito à tentativa de identificação da microbiota presente em sistemas proteolíticos, já que os microrganismos observados continuaram presentes ao longo de toda a fase experimental, quando o cuidado com a anaerobiose não foi mais negligenciado, e tomado de acordo com procedimento descrito previamente no item 4.6.3.

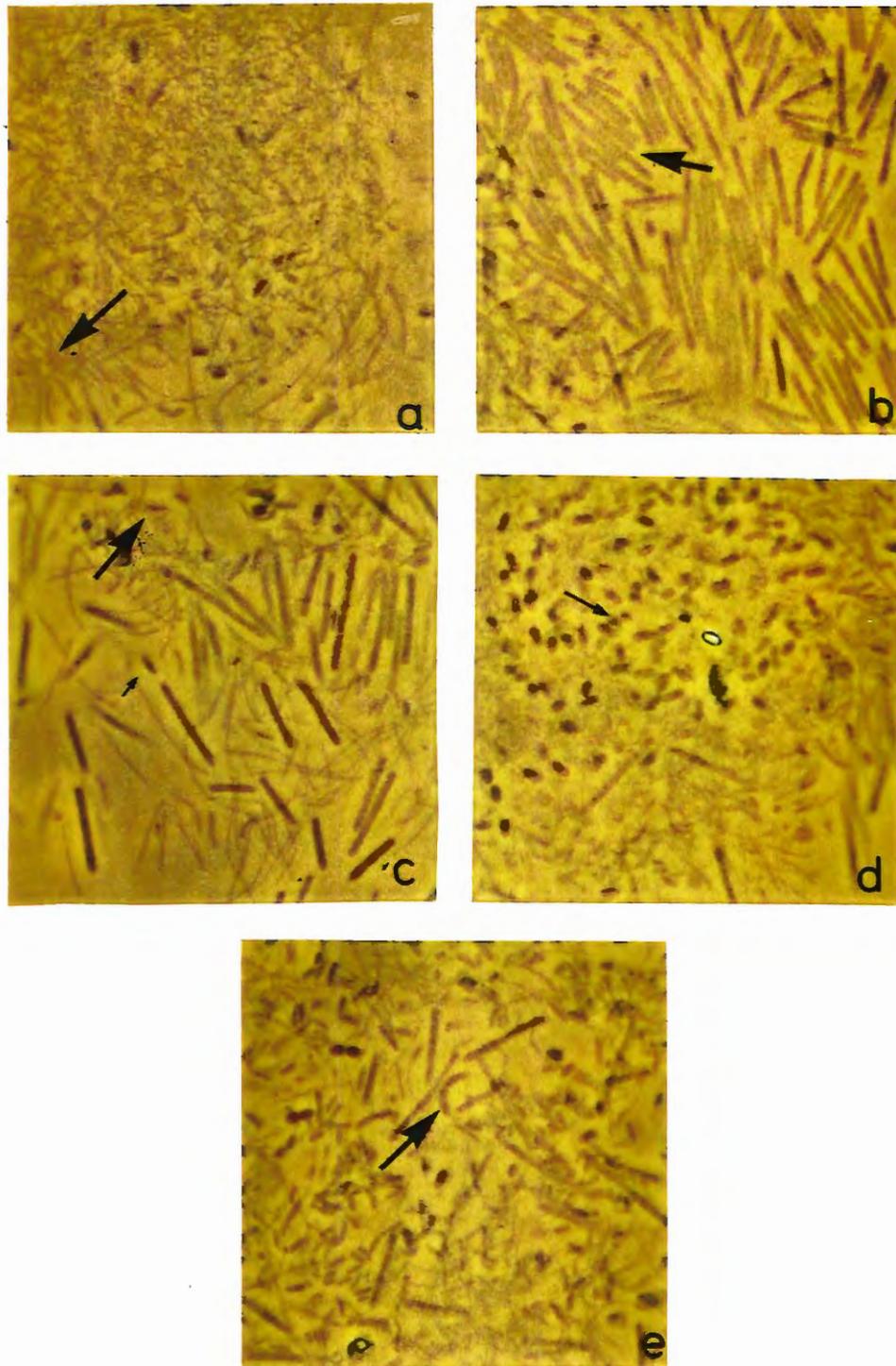


Figura 5.41: Morfologias predominantes do ensaio explorativo, organismos filamentosos (Figura 5.41 a), bacilos 1(Figura 5.41 b), bacilos 2 (Figura 5.41 c), cocos (Figura 5.41 d), e bacilos curvos (Figura 5.41 e). Observação sob contraste de fase (ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

### 5.3.2. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LODO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE GELATINA (com lodo proveniente de RHALF tratando substrato sintético simulando esgoto sanitário (SARTI, 1998))

Após o término da fase experimental de determinação de parâmetros cinéticos de degradação anaeróbia de gelatina, cuja duração foi de aproximadamente 65 dias, incluindo período de adaptação, realizou-se a caracterização microbiológica do lodo proveniente do RAHLFd, por meio de microscopia de contraste de fase, de fluorescência e eletrônica de varredura.

Nas observações realizadas ao microscópio eletrônico utilizaram-se 6 amostras constituídas por matrizes retiradas da entrada, do meio e da saída do reator, observadas interna e externamente. A amostragem em três pontos do reator teve como intuito a verificação da veracidade de se tratar de um reator diferencial.

Em todas as seis amostras, pôde-se verificar a presença das mesmas morfologias, o que comprovou que o sistema utilizado na presente pesquisa constituiu-se de um reator diferencial, sendo portanto, próprio para a determinação de parâmetros cinéticos de acordo com metodologia proposta por ZAIAT (1996).

A partir das análises de microscopia de contraste de fase e de varredura, pôde-se então, observar as seguintes morfologias predominantes presentes na Figura 5.42: bacilos 1 (Figura 5.42 a), bacilos 2 (Figura 5.42 a), bacilos curvos (Figura 5.42 e), cocos 1 (Figura 5.42 b) e 2 (Figura 5.42 a), dois tipos de espiroquetas (Figura 5.42 a), e organismos filamentosos (Figura 5.42 e). Organismos semelhantes a *Methanosaeta* sp (Figura 5.42 c) e *Methanosarcina* sp foram observadas nas análises de microscopia de varredura, embora essa última tenha aparecido muito raramente. As análises de microscopia de fluorescência mostraram a predominância de bacilos finos e delgados além de cocos.

As morfologias encontradas no presente estudo foram também relatadas por SARTI, (1998), porém em seu trabalho, o autor não menciona a baixíssima ocorrência de morfologias semelhantes à *Methanosarcina* sp, como foi verificado nessa fase experimental.

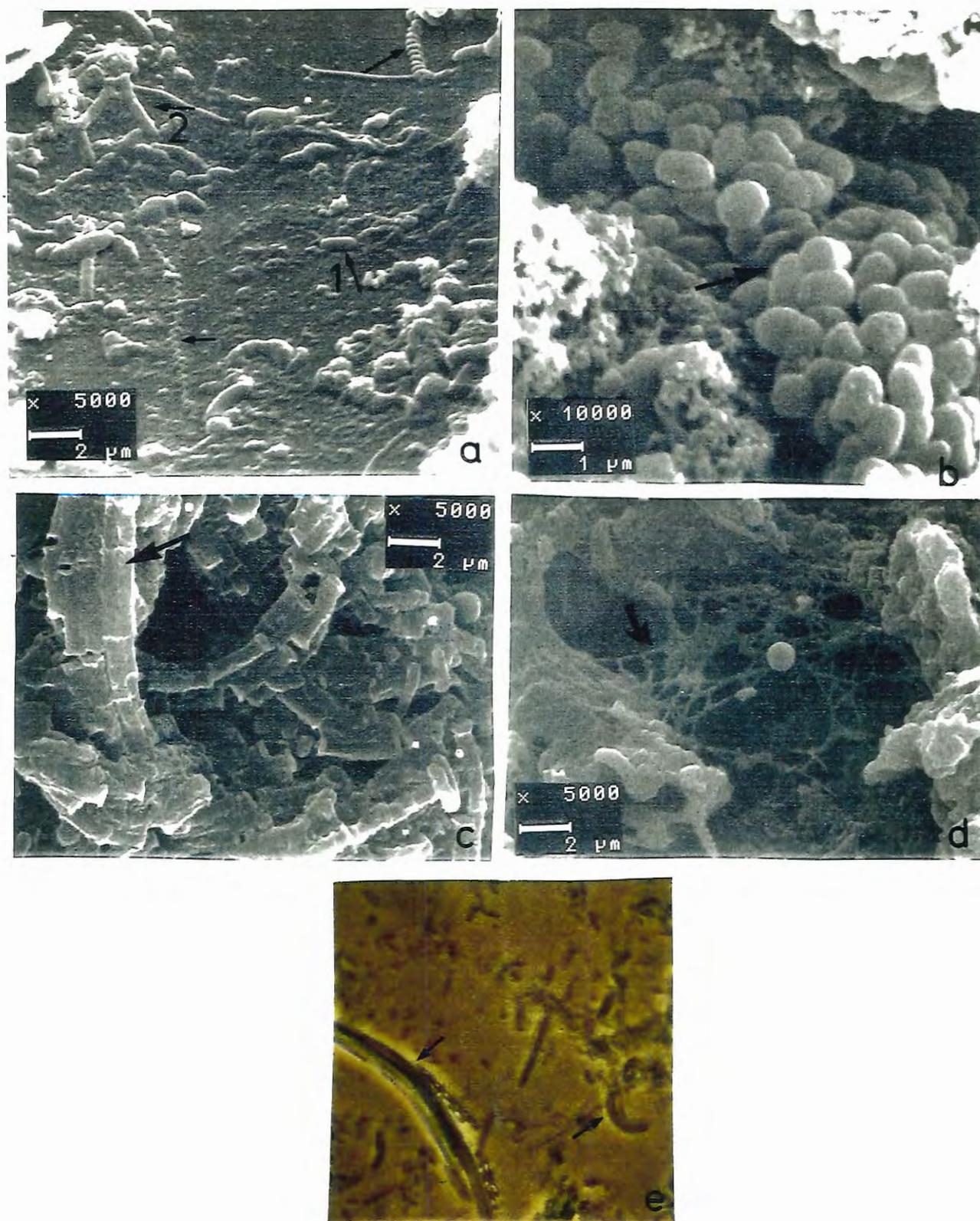


Figura 5.42: Micrografias das morfologias presentes no lodo proveniente do tratamento anaeróbio de substrato sintético simulando esgoto sanitário, bacilos 1 (Figura 5.42 a), bacilos 2 (Figura 5.42 a), bacilos curvos (Figura 5.42 e), cocos 1 (Figura 5.42 b) e 2 (Figura 5.42 a), dois tipos de espiroquetas (Figura 5.42 a), organismos semelhantes a *Methanoseta* sp (Figura 5.42 c), morfologia aderida a "teia" de exopolímeros e organismos filamentosos (Figura 5.42 e); (5.42a – d - observação sob MEV, 5.42e - observação sob contraste de fase, ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

A presença muito discreta das morfologias semelhantes *Methanosarcina sp* em relação à presença mais abundantes de morfologias semelhante à *Methanosaeta sp* pode estar relacionada com a baixa taxa de disponibilidade de acetato. Os valores de tais taxas podem ser devidos à baixas taxas de acetogênese, causadas pela complexidade do processo de hidrólise de moléculas de proteína. Segundo GUGER e ZEHNDER (1983), com baixas concentrações de substrato, a taxa máxima de crescimento das bactérias *Methanosaeta sp* é maior que taxa máxima das bactérias *Methanosarcina sp*.

### 5.3.3. EXAMES SOB MICROSCOPIA DE FORMAÇÃO E EVOLUÇÃO POPULACIONAL DO BIOFILME PROTEOLÍTICO

Para o monitoramento da formação, e posterior caracterização microbiológica do biofilme proteolítico aderido à espumas de poliuretano, operou-se quatro reatores em paralelo de acordo com procedimento previamente descrito na Figura 4.2

A partir da abertura sequencial dos quatro reatores operados nos 6°, 11°, 16° e 22° dias de operação do sistema, pôde-se obter amostras para análises de microscopia de contraste de fase, eletrônica de varredura e fluorescência que auxiliaram na determinação da microbiota presente no biofilme, assim como na tentativa de sequenciamento evolutivo de aparição de tais morfologias.

Os resultados obtidos a partir de micrografias provenientes de observações realizadas em microscópio de varredura evidenciaram os três padrões de imobilização presentes na Figura 5.43. Esses padrões encontrados foram: células isoladas (Figura 5.43 a), biofilmes aderidos, possivelmente fisicamente, à superfície das espumas de poliuretano (Figuras 5.43 b e c) e microestruturas retidas, possivelmente mecanicamente nos poros das matrizes (Figuras 5.43 d e e)

É possível que as estruturas mostradas pelas Figuras 5.43 a (6° dia), b e c (ambas 11° dia) façam parte de um processo evolutivo de formação do biofilme em espumas de poliuretano, que culminaria com a estrutura presente na Figura 5.43 f. (também 11° dia). Porém, para precisar tal informação, seria necessário acompanhamento microscópico anterior ao 6° dia de operação (primeira amostragem desse experimento).

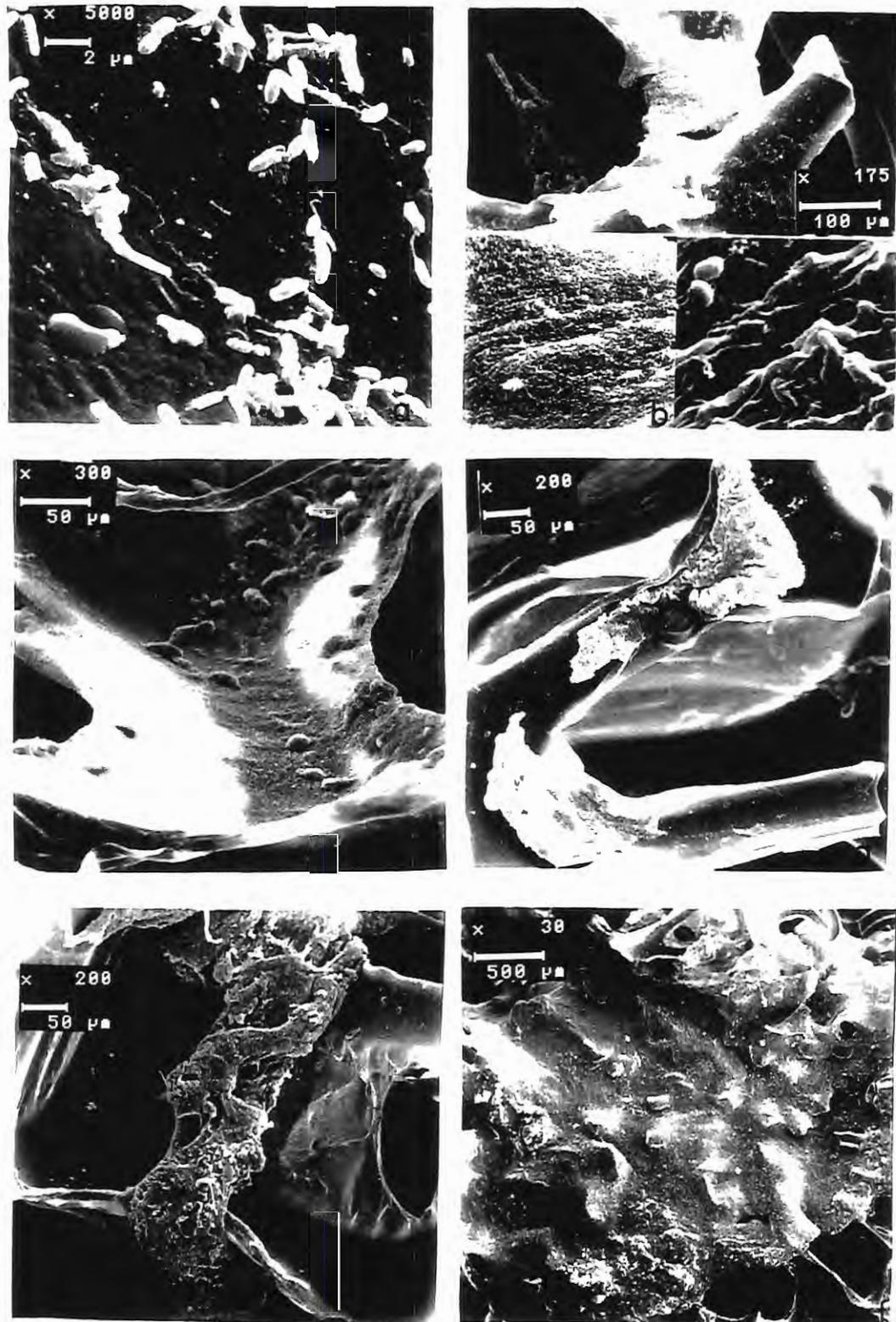


Figura 5.43. Padrões de imobilização microbiana no biofilme proteolítico. células isoladas (Figura 5.43 a), biofilmes aderidos, possivelmente fisicamente, à superfície das espumas de poliuretano (Figuras 5.43 b e c) e microestruturas retidas, possivelmente mecanicamente nos poros das matrizes (Figuras 5.43 d e e) – observação sob MEV.

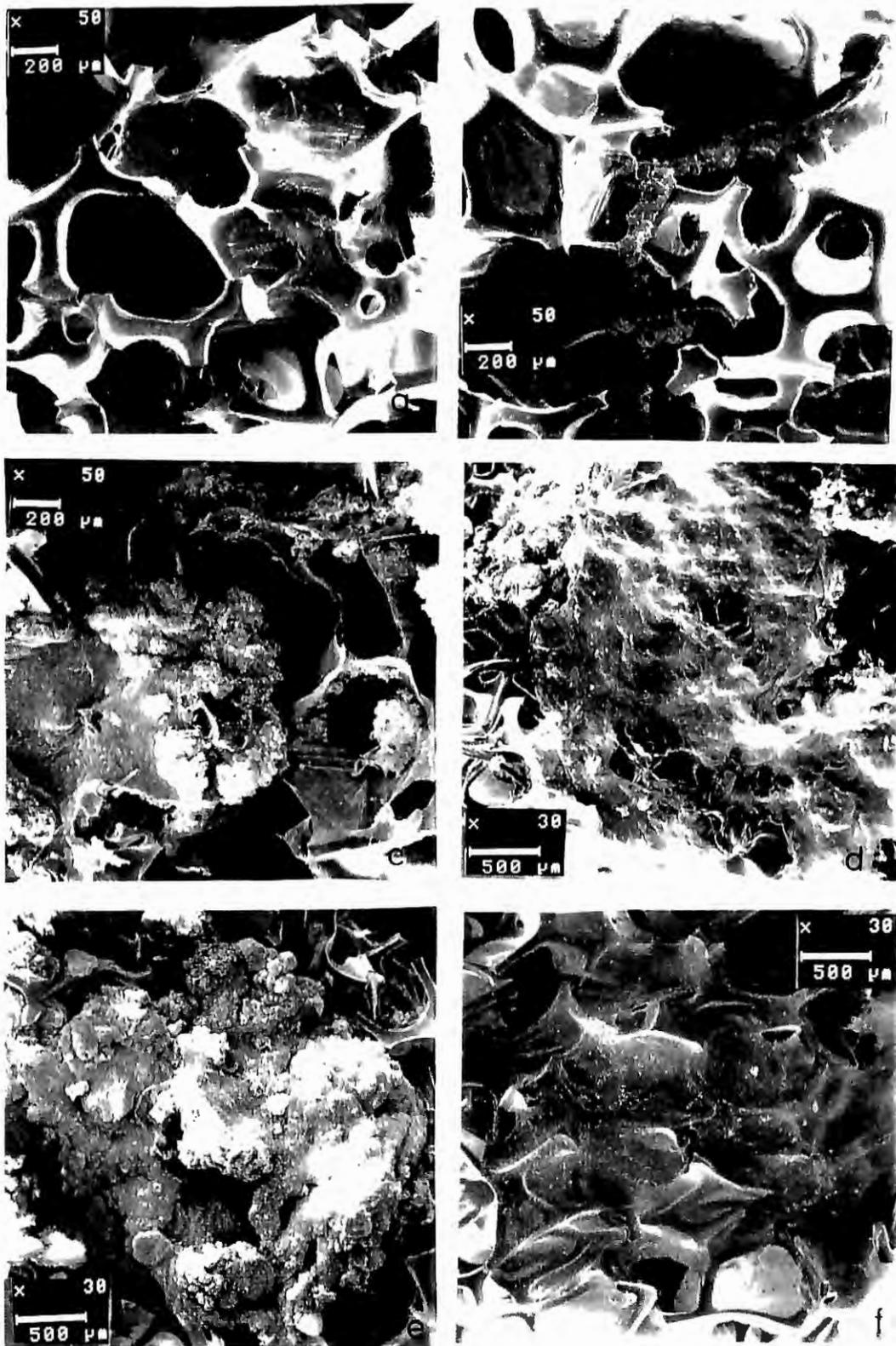


Figura 5.44: Evolução quantitativa do crescimento do biofilme ao longo do experimento realizado. as figuras 5.44 a,b e c correspondem ao 6º dia de operação dos reatores. figuras 5.44d, e e f. correspondem ao 11º, 16º e 22º dias respectivamente- observações sob MEV.

Os mesmos padrões de imobilização celular foram relatados previamente por VARESCHE et al. (1997), observando matrizes de espuma de poliuretano retiradas de RAHLF de bancada tratando substrato sintético a base de glicose.

Pode-se observar na Figura 5.44 evolução quantitativa do crescimento do biofilme ao longo do experimento realizado. As Figuras 5.44 a,b e c correspondem ao 6º dia de operação dos reatores, enquanto as Figuras 4.44d, e e f, correspondem ao 11º, 16º e 22º dias respectivamente.

Os quatro reatores apresentaram desde o segundo dia de operação sinais de colonização. Notaram-se duas cores predominantes cobrindo as matrizes colonizadas, preta, cujas morfologias presentes podem ser visualizadas na Figura 5.44 c, e laranja, sendo que essa última apresentava duas variações, clara e escura, cujas morfologias podem ser visualizadas nas Figuras 5.44 a e 5.44 b, respectivamente.

No terceiro dia de operação notou-se que a cor predominante era a laranja escura e as matrizes colonizadas representavam cerca de 50% dos volumes dos reatores. Aglomerados pretos também eram observados, em menor número. É importante ressaltar que as colonizações das matrizes se deram no sentido da entrada do escoamento do reator, para a saída.

Até o 11º dia de operação o substrato foi administrado segundo livre demanda, ou seja, quando o valor da DQO atingia níveis mínimos, o meio líquido era substituído por outro com DQO inicial de aproximadamente 500 mg / L. Ao final desse período, observou-se que a coloração preta predominava em todos os reatores cobrindo suas matrizes praticamente em sua totalidade. A coloração das matrizes evoluiu figurativamente de acordo com a figura 4.45 ao longo do tempo.



Figura 5.45: Evolução da coloração das matrizes colonizados até o 11º dia de operação .

A partir do 11º dia de operação, o meio líquido foi trocado a cada 24 horas, tendo esta operação transcorrido dessa forma até o fim do período experimental. A Figura 5.46 mostra a demanda de alimentação dos quatro reatores ao longo do

experimento de acompanhamento da formação e evolução populacional do biofilme proteolítico.

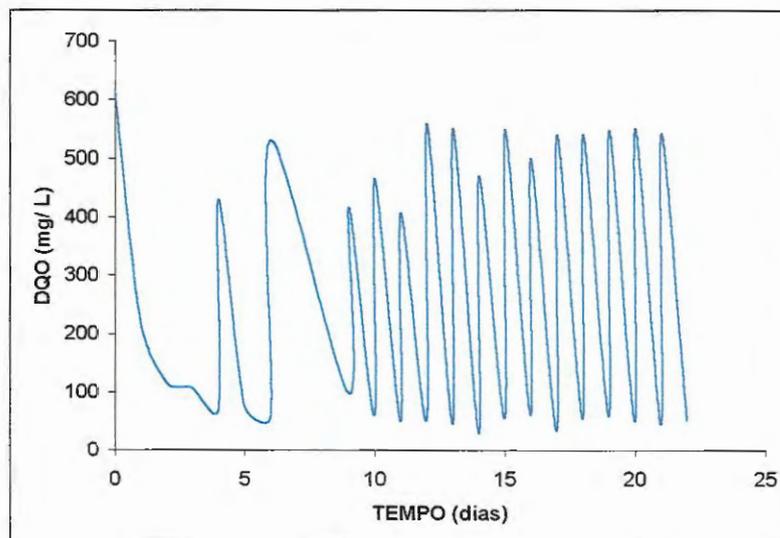


Figura 5.46: Demanda de alimentação dos quatro RAHLFd ao longo de 22 dias de experimento

O pH do meio manteve-se na faixa de 7,0-7,8 ao longo de toda a operação, valores adequados para a atuação do consórcio metanogênico ( FORESTI, 1994).

#### 5.3.3.1. Observação microscópica do reator aberto no 6º dia de operação

A primeira amostra, correspondente ao 6º dia de operação foi composta por matrizes pretas e alaranjadas. Já neste dia pôde-se observar (Figura 5.48c, parte inferior) a existência de uma estrutura bem definida de biofilme.

As análises de microscopia de contraste de fase e eletrônicas de varredura evidenciaram, nas matrizes alaranjadas, a predominância de bacilos semelhantes à microorganismos do gênero *Clostridium* (Figura 5.47a, b, f e g). Estas bactérias metabolizam vários aminoácidos na fase fermentativa do processo anaeróbio. Isso ocorre sob condições de intensa degradação de proteínas, através de reações de oxirredução (Reações de Stickland) envolvendo um aminoácido servindo como doador de elétrons e outro como aceptor. Como resultado, tem-se a desaminação ou descarboxilação dos aminoácidos envolvidos (ATLAS, 1996). SIEBERT & TORIEN (1969) citaram a predominância desse gênero de bactérias ao observarem amostras de lodo provenientes de estações de tratamento de esgoto sanitário, o que demonstra

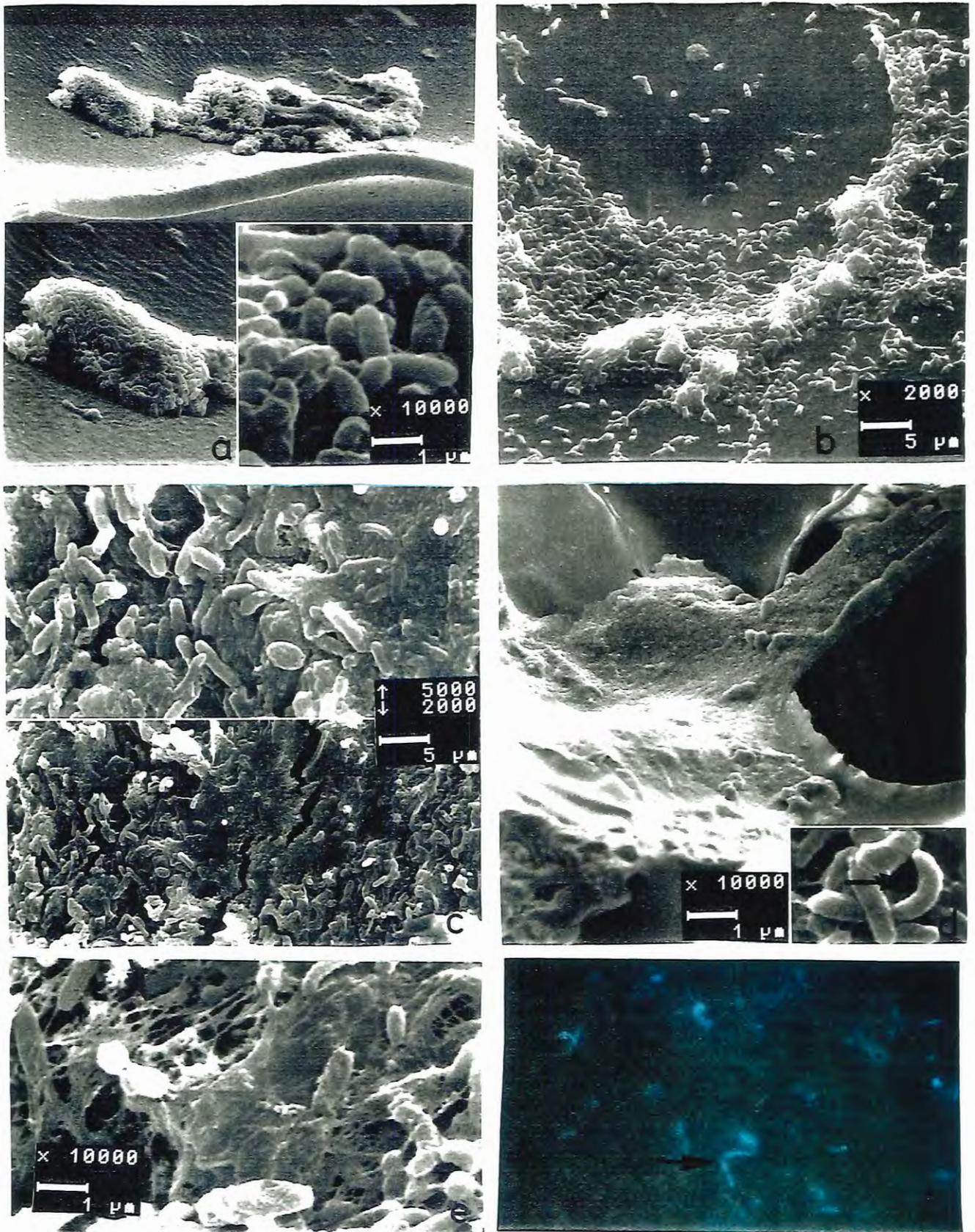


Fig. 5.47: Morfologias presentes no 6º dia de operação do RAHLFd, 5.47 a. e b - bacilos, 5.47 c - fissuras do biofilme, 5.47 d - bacilos curvos. 5.47 e. - exopolímeros - observações sob MEV e 5.47 f - bacilos fluorescentes. - observação sob contraste de fase, ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

que a degradação protéica é parte fundamental da estabilização desse tipo de água residuária, como afirmou TORRES (1989).

Outras morfologias encontradas foram cocos, presentes como bactérias isoladas, ou como conglomerados no biofilme (Figuras 5.47 b e c). Estes microrganismos pertencem provavelmente ao gênero *Staphilococcus* e *Streptococcus*, e são descritos por CHENG et al. (1979) como proteolíticos anaeróbios facultativos, podendo estar relacionados com a coloração alaranjada presente nas matrizes dos reatores, pois segundo MADINGAN et al. (1997) são responsáveis pela produção de um pigmento carotenóide de cor amarelada. Bacilos curvos semelhantes à *Desulfovibrio sp* também estavam presentes nas matrizes alaranjadas (Figura 5.47 d). Apesar da existência de baixos níveis de concentração de sais de sulfato adicionados ao meio, e das concentrações de cisteína (aminoácido rico em enxofre) serem inexistentes na composição da molécula de gelatina (SCHIAVUZZO, 1997 e MERCK IINDEX), estes tipos de microrganismos podem realizar a fermentação do acetato. Enfim, de acordo com as morfologias presentes nas matrizes, possivelmente, os processos de fermentação e hidrólise foram os predominantes no interior das matrizes alaranjadas.

As mesmas morfologias associadas ao processo proeolítico fermentativo foram encontradas nas matrizes pretas. Todavia, observações sob microscopia de fluorescência evidenciaram também a presença de bacilos e cocos (Figura 5.47 7), provavelmente do gênero *Methanobacterium*, *Methanococcus* e *Methanobrevibacter*. A maioria desses organismos metanogênicos são utilizadores de H<sub>2</sub> como fonte de energia, normalmente, utilizando acetato como fonte de carbono.

Como a presença de aminoácidos e acetato são estimulantes ao crescimento de algumas espécies (König, 1984) a remoção de acetato do meio (evidenciada pelo acentuado decréscimo de DQO), provavelmente esteve associada com o crescimento celular e não com a produção metanogênica.

Outra informação importante acerca das matrizes de coloração preta, foi a presença de polímeros celulares em grande quantidade (Figura 5.47e) o que evidencia, mais uma vez, a presença de fortes ligações entre as bactérias e entre tais microrganismos e as matrizes utilizadas como suporte.

### 5.3.3.2. Observação microscópica do reator aberto no 11<sup>o</sup> dia de operação

Nas amostras coletadas no 11<sup>o</sup> dia de operação foi observado o aumento de estruturas como fimbrias, glicocálixes além de polímeros extracelulares. A Figura 5.48 a mostra a união de duas células por meio de polímeros extracelulares, e a Figura 5.48 b mostra os polímeros reforçando a ligação de um bacilo com o meio suporte. A presença dos polímeros parece ter dificultado os exames sob microscopia óptica de fluorescência (Figura 5.48f). As mesmas espécies já descritas permaneceram presentes nestas matrizes, aparentemente em maior número (Figuras 5.48d e e), além de outras três morfologias: bacilos maiores (5.48e), um organismo filamentosos, e uma típica morfologia de *Spirocheta* (Figura 5.48 a, b e c). Os bacilos maiores e os organismos filamentosos provavelmente pertencem também ao gênero *Clostridium* ou *Eubacterium*, bactérias hidrolíticas fermentativas estritamente anaeróbias.

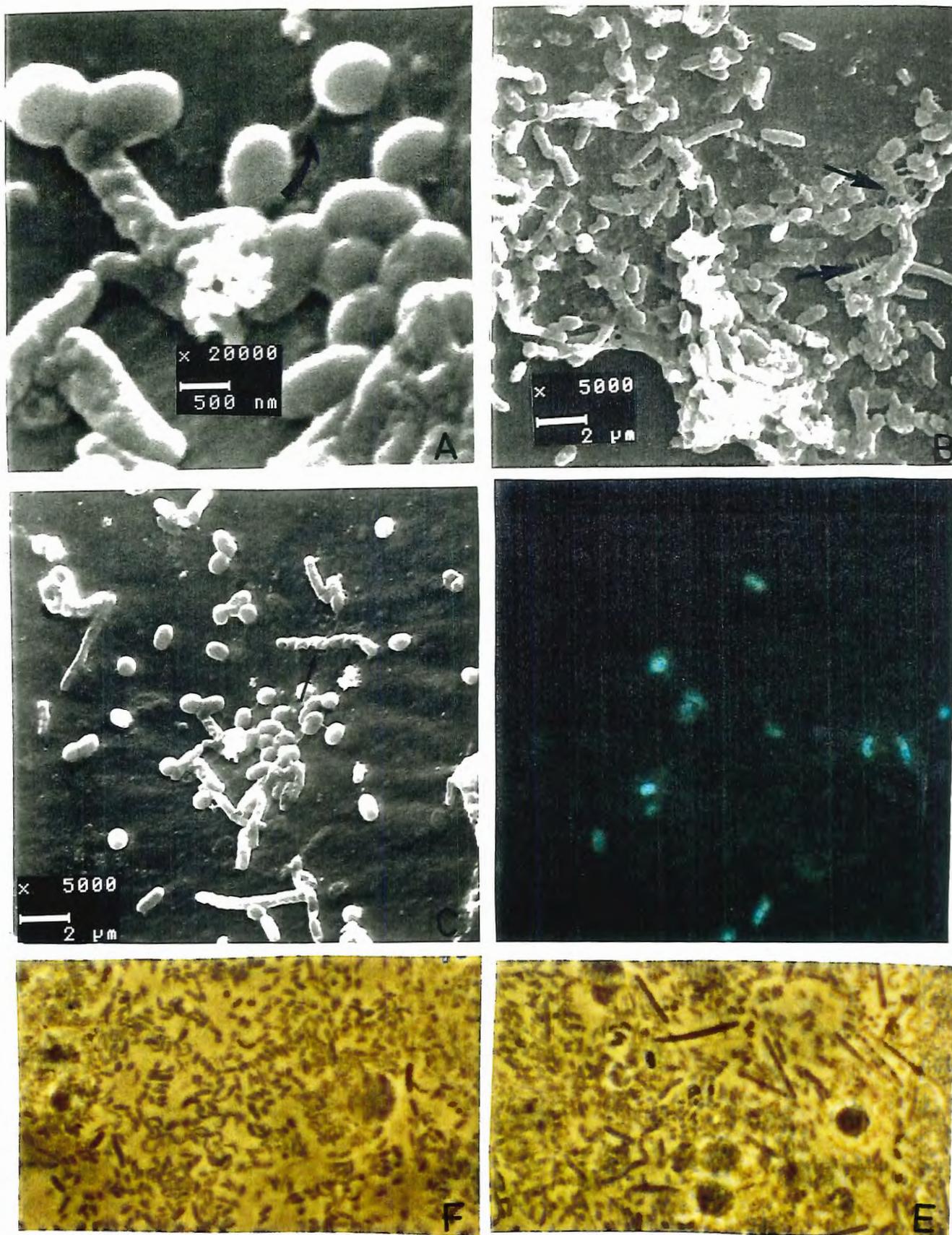


Fig. 5.48: Morfologias presentes no 11º dia de operação, 5.48a - fimbria ou polímero, 5.48b - polímeros, 5.48 c - espiroquetas, - observações sob MEV. 5.48 d - fluorescência de bacilos e cocos 5.48 e e f- morfologias já presentes no 6º dia de operação, aparentemente em maior numero,- observação sob contraste de fase, ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto).

#### 5.3.3.3. Observação microscópica do reator aberto no 16º dia de operação

Morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp* foram evidenciadas por microscopia óptica de contraste de fase no 16º dia de operação (Figura 5.49a). Porém, tendo sido essa ocorrência em pequeno número conclui-se que aparentemente, a conversão de acetato a metano não foi tão importante neste experimento como usualmente o é em reatores anaeróbios alimentados com substratos líquidos diluídos. Análises de microscopia de fluorescência continuaram evidenciando a presença de bacilos (Figura 5.49b) e cocos, porém a dificuldade de foco já mencionada persistiu, dificultando a visualização perfeita desses microrganismos.

Os bacilos maiores já observados no 11º dia de operação aparentemente tiveram crescimento expressivo nesse último período (Figura 5.49e) e se apresentaram, em algumas micrografias, formando grandes aglomerados, possivelmente associados (Figura 5.49d) à bactéria filamentosa também já identificada desde o 11º dia.

Além de todas as morfologias relatadas (parecendo sempre estarem aumentando em número) uma outra morfologia foi observada: uma bactéria filamentosa muito fina, semelhante à identificada por WIDDEL, (1988), com sendo uma não nominada redutora de sulfato, com finas e extremamente longas células, fisiologicamente semelhantes à *Desulfovibrio sp*.

#### 5.3.3.4. Observação microscópica do reator aberto no 22º dia de operação

As matrizes de poliuretano obtidas no 22º dia de operação foram submetidas ao exame sob microscopia de varredura interna e externamente. As Figuras 5.50 a (parte exterior) e b (parte interior) mostram que as morfologias praticamente não diferem quanto à sua localização ao longo da profundidade das matrizes.

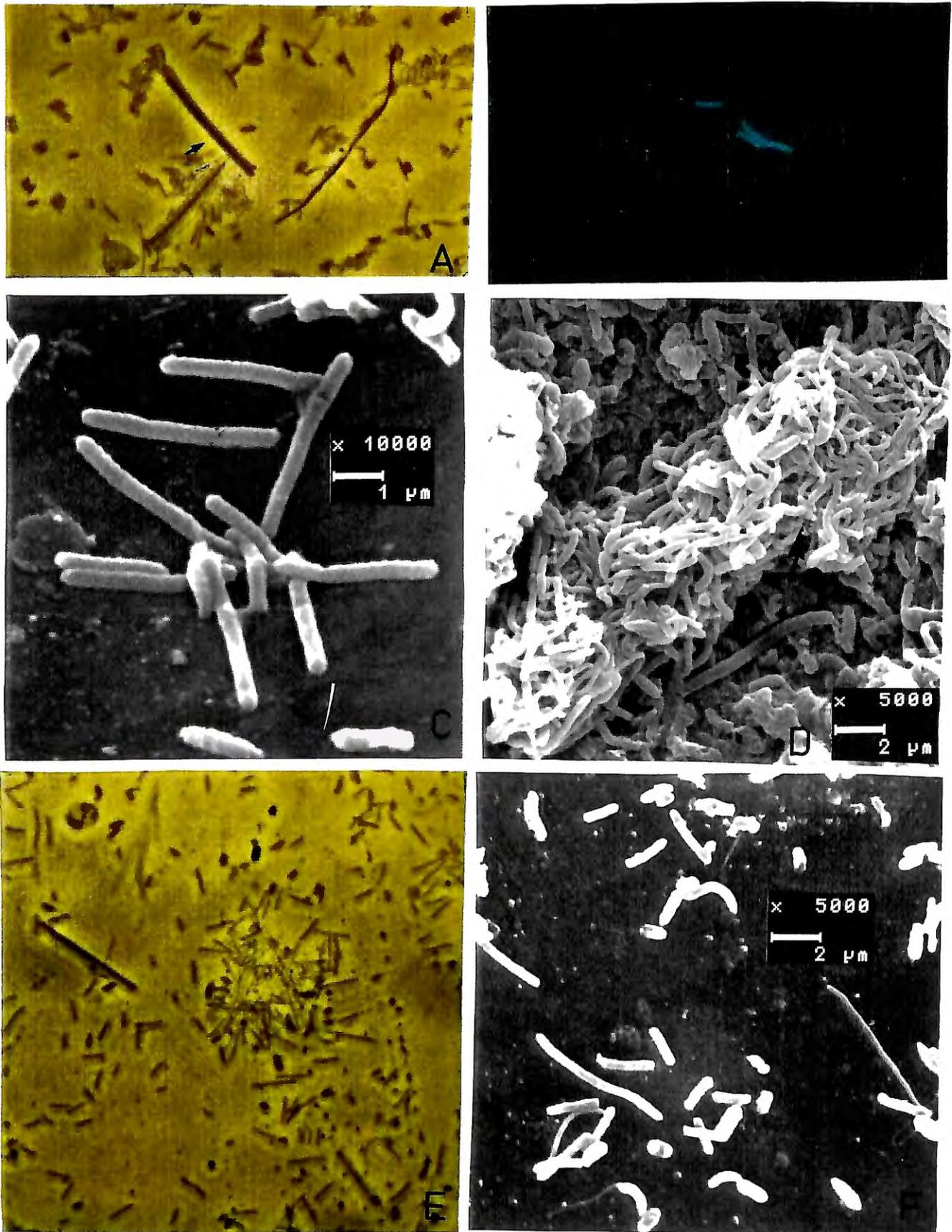


Figura 5.49: Morfologias presentes no 16º dia de operação – 5.49a - morfologia semelhante ao gênero *Methanosaetha*, 5.49b - bacilos fluorescentes, 5.49c - bacilos 2, 5.49 d organismos filamentosos – observação sob MEV, 5.49e e f - morfologias citadas anteriormente - observações sob contraste de fase, ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

A Figura 5.50 c evidencia que na parte interna das matrizes, além de microrganismos provavelmente retidos mecanicamente, existe a formação bem estruturada de biofilmes.

Na Figura 5.50 b pode-se observar a presença de estruturas semelhantes a polímeros, fimbrias ou glicocálixes, evidenciando a presença de ligações firmes entre os microrganismos e o meio suporte utilizado, assim como observaram, VARESCHE, (1997), ZAIAT, (1997) e GIJZEN, (1988), estudando a degradação de outros substratos. Tanto os resultados obtidos neste experimento, quanto os obtidos por VARESCHE et al. (1997), GIJZEN et al. (1988) e ZAIAT et al. (1996), contradizem as afirmações de FYNN & WHITMORE (1984), que estudando a aderência de uma cultura metanogênica enriquecida em matrizes de poliuretano, concluíram que a adesão dos microrganismos a tal suporte é fraca e facilmente destruída. É importante dizer que os citados autores também concluíram que possivelmente uma cultura mista, alimentada com um substrato mais complexo, poderia se aderir mais firmemente, assim como ocorreu no presente trabalho científico.

As mesmas morfologias descritas anteriormente continuaram a ser observadas (Figuras 5.50 a, b e d) e os três padrões de imobilização já relatados, células isoladas, conglomerados e biofilmes (Figuras 5.51 e, d e c, respectivamente) se mantiveram até o momento da retirada desta amostra.

As observações ao microscópio eletrônico demonstraram que as morfologias semelhantes às *Spirochaetas sp* aumentaram em número ou, como não houve nenhum procedimento de contagem, simplesmente tornaram-se presentes com maior frequência (Figura 5.50 e).

O mesmo pode ser dito das bactérias filamentosas finas e longas, porém tal evidência se deu em função de micrografias provenientes de análise microscópicas de contraste de fase (Figura 5.50 f).

As micrografias de fluorescência evidenciaram um aumento da quantidade das espécies metanogênicas previamente relatadas, principalmente dos bacilos (Figuras 5.50 g e h).

Pode-se notar na figura 5.44 f a ausência dos grandes conglomerados, já observados (Figuras 5.44 c, d e e) nos poros das matrizes. De fato, a maior parte da

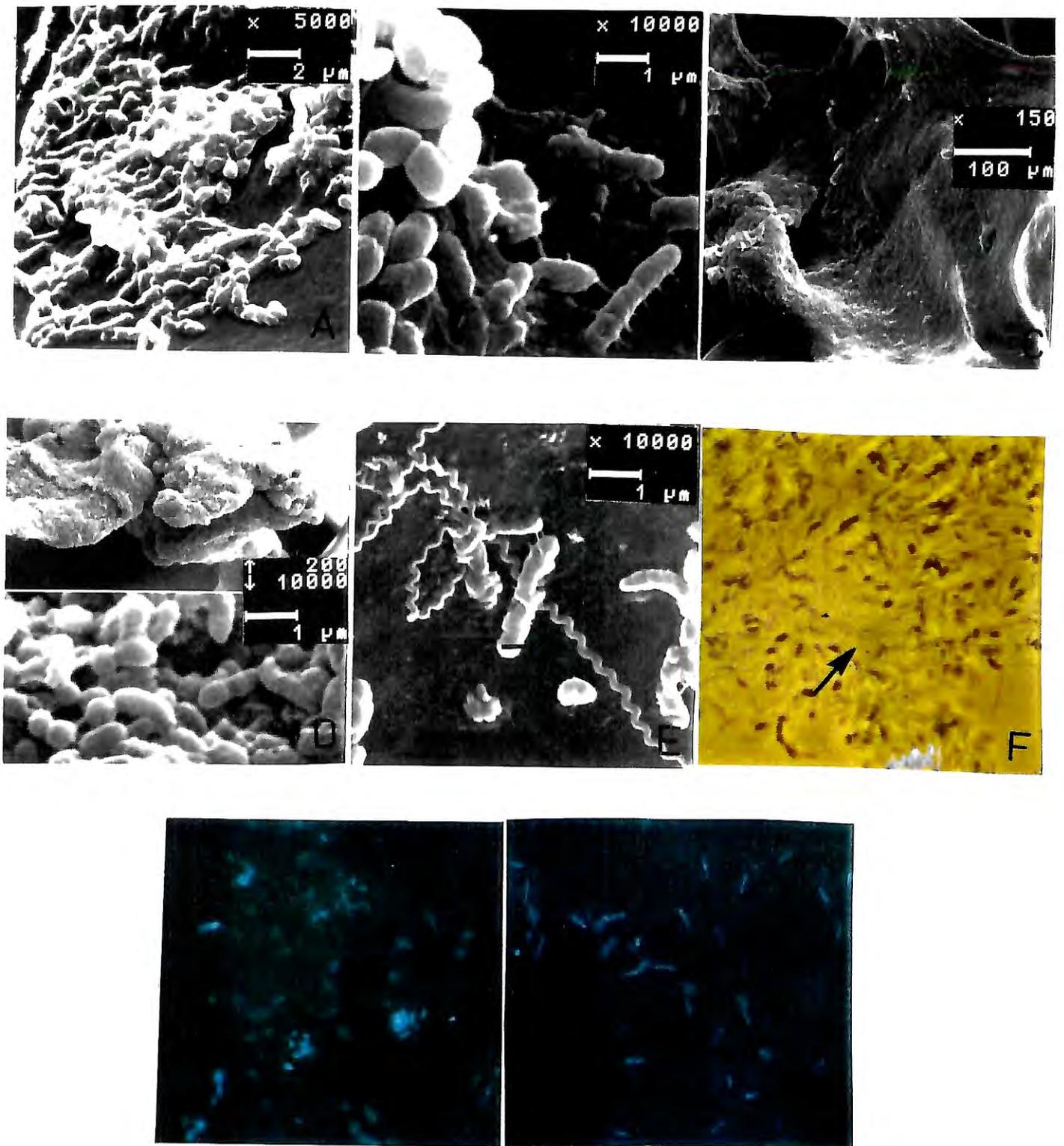


Fig. 5.50: Morfologias e estruturas presentes no 22º dia de operação 5.50 a – parte exterior da matriz, 5.50b – parte interior da matriz, 5.50c – biofilme bem estruturado, - exames sob MEV, 5.50d – conglomerados, 5.50e – espiroquetas, 5.50 f – organismos filamentosos, 5.50 g, h – bacilos e cocos fluorescentes – exames sob sob contraste de fase, ocular 10; objetiva 100; zoom de 1,25; ampliação da foto)

biomassa retida foi perdida durante o processo de preparação, segundo Araújo (1995) para a microscopia de varredura. O biofilme poderia estar nessa fase em um processo de despreendimento de camadas a fim da manutenção de sua espessura, como afirma Campos (1994).

Embora algumas das características morfológicas da biomassa presente nas matrizes de poliuretano tenham mudado do 11<sup>o</sup> ao 22<sup>o</sup> dia de operação, pode-se dizer que a estabilidade operacional do processo foi encontrada por volta do 10<sup>o</sup> dia de operação. A partir de então, a eficiência diária de remoção de matéria orgânica manteve-se praticamente constante.

As morfologias presentes identificadas nesse ensaio foram as mesmas descritas anteriormente no ensaio explorativo e no ensaio de identificação das morfologias presentes no experimento de determinação de parâmetros cinéticos de utilização de gelatina, porém nota-se claramente a quantidade menor de bactérias semelhantes à *Methanosaeta sp* e a completa ausência de bactérias semelhantes à *Methanosarcina sp*. Levando-se em consideração que o inóculo para esse ensaio foi proveniente de água residuária das últimas três bateladas do experimento cinético, e a aparente estabilidade operacional do sistema, provavelmente a conversão de acetato a metano não se constitui em etapa tão importante na degradação de proteína como é de carboidratos. Porém, como notou-se a formação intensa de gases durante toda a parte experimental realizada, a composição do gás formado, assim como sua quantidade devem ser melhor estudados para permitir o melhor entendimento do processo

## 6. CONCLUSÕES

✓ O consórcio microbiano presente no lodo imobilizado nas matrizes de poliuretano provenientes de um RAHLF de bancada, utilizado anteriormente para a degradação anaeróbia de substrato sintético simulando esgoto sanitário, adaptou-se ao processo de degradação anaeróbia de gelatina em RAHLFd após 10 dias de operação (5 bateladas de 48 de duração).

✓ O processo de degradação anaeróbia de substrato sintético contendo gelatina como única fonte de carbono, à concentração inicial de 500 mg/L, em reator horizontal diferencial de leito fixo, para a faixa de velocidade estudada, se ajusta, com bons coeficientes de correlação, tanto para modelo cinético do tipo Monod (linearização de Hanes-Woolf), quanto a modelo cinético do tipo primeira ordem. Todavia, devido à variação observada nos valores de  $K_s$ , que não seguiram tendência definida, considera-se que o modelo de primeira ordem exprima mais adequadamente o processo estudado, como também verificou SCHIAVUZZO (1997).

✓ Provavelmente, os processos de transferência de massa interna e externa se mostraram igualmente limitantes do processo, devido ao elevado peso molecular adotado para a molécula de gelatina. Tal fato pôde ser confirmado quando analisou-se o módulo de Thiele observado, cujos valores foram bem superiores àqueles considerados na literatura como limite para o desprezo da resistência à transferência de massa interna, e o número de Biot, cujos valores encontravam-se bem aquém dos recomendados para o desprezo da resistência de transferência de massa externa.

✓ Os valores de  $r_{\text{máx}}$  aparentes (mg SAB / h . mL de suporte) estimados para o lodo proveniente de tratamento anaeróbio de substrato sintético simulando esgoto sanitário, para a degradação anaeróbia de gelatina foram de 3,0; 3,6; 4,0 e 5,0, e os valores de  $K_s$  (mg SAB / L) foram de 82; 118; 93 e 148 para as velocidades superficiais de 0,023; 0,045; 0,067; 0,089 cm / s respectivamente.

✓ O valor de  $r_{\text{máx}}$  aparente estimados para o biofilme cujo crescimento foi monitorado foi 2,34 mg SAB / h . mL de suporte e o valor de  $K_s$  foi de 23 mg SAB / L, quando a velocidade superficial aplicada foi de 0,045 cm/s.

✓ Os valores de  $k_1$  ( $\text{h}^{-1}$ ) estimados para a biomassa previamente arranjada foram 0,11; 0,11; 0,14; 0,15 para as velocidades de 0,023; 0,045; 0,067 e 0,089 cm / s respectivamente. Já para o biofilme cujo desenvolvimento foi monitorado, o valor de  $k_1$  encontrado foi 0,19  $\text{h}^{-1}$

✓ Biofilmes formados exclusivamente a partir da degradação anaeróbia de proteínas demonstram taxas de consumo de substrato mais eficientes, quando comparas às taxas obtidas, para um consórcio microbiano previamente arranjado para o tratamento de outro substrato (também contendo proteínas), para cinética de primeira ordem. O valor de  $K_s$  é extremamente inferior, para o biofilme formado, à faixa de valores obtidos, para o biofilme previamente arranjado para cinética tipo Monod. O fato das taxas de consumo de substrato da biomassa previamente arranjada (para cinética do tipo Monod) serem ligeiramente maiores que a obtida para o biofilme formado, pode estar relacionada a quantidade muito superior de biomassa presente nas matrizes provenientes do RAHLF de bancada.

✓ Provavelmente o processo acetoclástico não tem muita importância na degradação anaeróbia de gelatina, o que pode indicar que a molécula de gelatina possui predominantemente aminoácidos, cuja degradação se dá via reações acopladas de oxirredução entre os próprios aminoácidos como as reações de Stickland



- ✓ O processo anaeróbio de degradação de proteínas partindo sem prévia imobilização de biomassa chegou à estabilidade por volta do 11<sup>o</sup> dia de operação nas condições estudadas.
  
- ✓ O biofilme microbiano estudado teve seu início na adesão de bactérias hidrolíticas fermentativas, que produziam um pigmento amarelado. A estabilidade do processo foi atingida quando foi observada a predominância da coloração preta nas matrizes (cor característica de biofilmes metanogênicos).
  
- ✓ Os microrganismos encontrados com maior frequência eram provavelmente proteolíticas fermentativas e metanogênicas hidrogenotróficas.

## 7.RECOMENDAÇÕES

- ✓ Realização de pesquisa semelhante utilizando substratos sintéticos contendo carboidratos e lipídeos como única fonte de carbono.
- ✓ Utilização de outras proteínas com estrutura terciária e/ou quaternária mais complexas que a gelatina em reator anaeróbio de leito fixo em bancada.
- ✓ Adição de outras fontes de carbono ao substrato protéico, para a reavaliação da cinética de degradação anaeróbia de proteína em reator de leito fixo de bancada.
- ✓ Utilização de técnicas de biologia molecular para a melhor identificação da biomassa presente o processo.
- ✓ Utilização de técnicas de cromatografia para a análise dos produtos de hidrólise, e com isso traçar possíveis rotas metabólicas da degradação anaeróbia de proteínas em reatores anaeróbios de leito fixo

## 8. BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, J. C. *Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético*. Dissertação de Mestrado - SHS - EESC - USP 1995, 158p.

BAILEY, J. E & OLLIS, D. F. (1986) *Biochemical engineering fundamentals*. 2<sup>nd</sup> edition. McGraw-Hill, New York

BLACKBURN, T. H. & HOBSON, P. N. (1962) Further studies on isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen. *J. Cienn. Microbiol.* 29:69 – 81 Apud McINERNEY, M. J. (1988). Anaerobic hidrólisis and fermentation of fats and proteins. In: Zehnder, A. J. B. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. John Wiley & Sons, Inc, pp. 381 - 402.

BOBBIO, P. A. & BOBBIO, F. O. (1992). *Bioquímica dos alimentos*. 2<sup>a</sup> Edição, Livraria Varela, SP, 223p.

BRYERS, J. D. (1988). Modeling biofilm accumulation. In: BAZIN, M. J.; DROSSER, J. I. Ed. "Physiological models in microbiology", v.2, Séries in *Mathematical models in microbiology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 109 - 144.

- CALZADA, J.F., ARRIOLA, M. C., CASTAÑEDA, H. O., GODOY, J. E., ROLZ, C. (1984). Methane from coffee pulp juice: experiments using polyuretane foam reactors. *Biotechnology Letters*, Vol. 6, No 6, 385 - 388.
- CAMPOS, J. R. (1992). Um estudo sobre reatores anaeróbios de leito expandido. In: *II TALLER REGIONAL SOBRE TRATAMIENTO ANAERÓBIO DE ÁGUAS RESIDUALES EN AMÉRICA LATINA*. Habana, 20-22 nov. 29p.
- CAMPOS, J. R. (1994). Biomassa fixa: reatores anaeróbios. In: *III TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO "TRATAMIENTO ANAERÓBIO DE AGUAS RESIDUALES"*. Montevideo, Uruguay, pp. 169 - 184.
- CATO, E. P.; GEORGE, L. W.; FINEGOLD, S.M (1984). – *Clostridium sp* in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – vol. 1. – Eds N. R. KRIEG & J. G. HOLT 964p
- COSTERTON, J. B., GEESEY, G. G., CHENG, K.-J. (1978). How bacteria stick.. *Sci. Am*, 238: no. 1, pp. 86 - 95.
- COPP, G. H. & KENNEDY, K. J. (1983) Support materials for downflow stationary fixed film (DSFF) methanogenic reactors. *J. Ferment. Technol*, 61, pp. 333 – 336 Apud VERRIER, D.; MORTIER, B.; DUBORGUIER, H. C.; ALBAGNAC, G. (1988). Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of biofilms. In: HALL, E. R.; HOBSON, P. N. Eds. "*Anaerobic Digestion 1988*". 5th *International Symposium on Anaerobic Digestion*. Ed. Pergamon Press, Oxford.

- DROSTE, R. L. & KENNEDY, K. J. (1986). Sequential substrate utilization and effectiveness factor in fixed biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, vol XXVIII, pp. 1713 – 1720.
- FORESTI, E. (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: *III TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO "TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES"*. Montevideo, Uruguay, pp. 97 - 110.
- 5  
FYNN, G. H. & WHITMORE, T. N. (1984). Retention of methanogens in colonised reticulated polyurethane foam biomass support particle. *Biotechnology Letters*, Vol. 6, No 2, 81 - 86.
- GABR, Y., MICHAEL, A. *Arzneimittelforsch.* 1967, 17, 1211. Apud REYNOLDS, E. F. (1982) *Martindale – The extra pharmacopeia*. Twenty – eighth Edition – The Pharmaceutical Press, pp954.
- 5  
GIJZEN, H.J., SCHOENMAKERS, T. J. M., CAERTELING, C. G. M., VOGELS, G.D. (1988). Anaerobic degradation of papermill sludge in a two-phase digester containing rumen microorganisms and colonized polyurethane foam.. *Biotechnology Letters*, Vol. 10, No. 1, 61 -66.
- GROTENHUIS, J. T. C. et al.(1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 57, No. 7, p.1942-2949

- GUIOT, S. R.; PAUSS, A. & COSTERTON, J. W. (1991). A structured model of the anaerobic granule consortium. *In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION PAPER PREPRINTS*, CETESB, IPT, SABESP e IAWPRC, São Paulo, pp.1-10.
- HAMILTON, W. A (1987) Biofilm: microbial interactions and metabolic activities. Pp 361 – 364. *In: The Society for General Microbiology Symposium, Cambridge. Ecology of microbial communities*, Cambridge University, Apud CAMPOS, J. R. (1994). Biomassa fixa: reatores anaeróbios. *In: III TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO “TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES”*. Montevideo, Uruguay, pp.169 - 184.
- HESPEL, R. B. & SMITH, C. J. (1983) Utilization of nitrogen sources by gastrointestinal tract bacteria, p. 167 – 187 in D. J. Hentges (ed), *Human intestinal microflora in health and disease*. Academic Press, New York. Apud: McINERNEY, M. J. (1988). Anaerobic hidrólisis and fermentation of fats and proteins. *In: Zehnder, A. J. B. Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. John Wiley & Sons, Inc, pp. 381 - 402.
- HUYSMAN, P.; VAN MEENEN, P.; VAN ASSCHE, P. & VERSTRETE, W. (1983). Factors affecting the colonization of non porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. *Biotechnology Letters* V. 5, No9, pp. 663 - 648 .
- KARUBE, I.; KURIYAMA, S.; MATSUNAGA, T.; SUZUKI, S. (1980). Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXII, pp. 847 - 857.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. (1993). *Principles of biochemistry* – Second Edition, Worth, 1013p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (1997)– *Brock biology of microorganisms* –18<sup>th</sup> Edition, Prantice Hall, NJ, 986p.

McINERNEY, M. J. (1988). Anaerobic hidrolisis and fermentation of fats and proteins. In: Zehnder, A. J. B. *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. John Wiley & Sons, Inc, pp. 381 - 402.

MEAD, G. C. (1971). The aminoacid-fermenting clostridia. *J. Ge. Microbiol.* 67:41 – 56. Apud McINERNEY, M. J. (1988). Anaerobic hidrolisis and fermentation of fats and proteins. In: Zehnder, A. J. B. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. John Wiley & Sons, Inc, pp. 381 - 402.

NAGASE, M. & MATSUO, T. (1982). Interactions between amino-acid-degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIV, Pp. 2227 - 2239.

NORTH, A. C. T. & ATWOOD, T. K (1991). *Protein structure*. Burlington: Cbr, 31p.

PARKIN, G. F. e SPEECE, R. E. (1983). Attached versus suspended growth anaerobic reactors: response to toxic substances. *Water science technology*. Vol. 15, Copenhagen, p. 261-289.

PASCIK, I. (1990). *Modified polyurethane carriers for biochemical waste water treatment*. *Wat. Sci.* Vol. 22 No. 1/2, pp. 33 - 42.

- PASSIG, F. H. (1997). *Estudo comparativo sobre a degradação de compostos orgânicos em biofilmes formados em meio suporte e grânulos desenvolvidos em um filtro biológico*. Dissertação de Mestrado - Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia de São Carlos / Univesidade de São Paulo.
- PERRY, R. H. & CHILTON, C. C (1973), Eds., *Chemical engineers hand-book*, 5<sup>th</sup> edition (McGraw-Hill, Toronto)
- REYNOLDS, E. F. (1982) *Martindale – The Extra pharmacopeia*. Twenty – eighth Edition – The Pharmaceutical Press, pp954.
- ROBINSON, R. W. et al. (1984). Light and electron microcopic examinations of methane-productin biofilms from anaerobic fixed bed reactors. *Applied and Envoironmental Microbiology*, pp. 127-136.
- SARTI, A.(1998). *Avaliação do desempenho do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RHALF) no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário*. Dissertação de Mestrado– Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia de São Carlos / Univesidade de São Paulo, 112p.
- SAYED, K. I. S. (1997). *Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using the UASB process*. [Tese de Doutoramento], pp 10 - 16

- SCHELEGEL, H. G. (1981). Allgemeine mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart, f.r.g.  
Apud SAYED, K. I. S. (1997). *Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using the UASB process*. [Tese de Doutorado], pp 10 - 16
- SCHLEIFER, K. H. (1984) Gram positive cocci, Setion 12 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – vol. 2. Eds N. R. KRIEG & J. G. HOLT 1599p.
- SCHIAVUZZO, M. A. (1997). *Estudos da degradação microbiana anaeróbia de proteínas (gelatina) em lodo de esgoto processado em reator anaeróbio de fluxo ascendente alimentado com substrato sintético com ênfase à cinética e produtos de hidrólise*. Tese de Doutorado – Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia de São Carlos / Univesidade de São Paulo, 279p.
- SHIEH, W. K. & MULCAHY, L. T. (1986) Experimental determination of intrinsic kinetic coefficients for biological wastewater treatment systems. *Water Science and Technology*, 18: 1-10.
- SIEBERT, M. L. & TOERIEN, D. F. (1968). The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sawage sludge. *Water Research*, Vol. 3, pp 241 -250.
- SNEATH, P. H. A. (1986). Endospore forming gram + rods and cocci. Section 13 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – vol. 2. 1599p.
- SPEECE, R. E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*. Vol.17 - nº9. pp.467A-427A.

SPEECE, R. E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewater*. Ed. Archae Press, Nashville, Tennessee, 394p.

STAMS, A. J. M., SKRABANJA, A. T. P., PLUGGE, C. M. (1994) *Degradation of glutamate and other amino acids by syntrophic associations of fermenting and methanogenic bacteria*. In: II TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO "TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES" Montevideoa – Uruguai, pp. 84 - 96.

TORRES, P. (1992). *Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário*. Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, S.P. 185p.

VARESCHE M. B., ZAIAT, M., VIEIRA, L. G. T., VAZOLLER, R. F., FORESTI, E. (1997). Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 4: 543 - 538, 1997.

Van HAANDEL, A. C. & LETTINGA, G. (1994). *Tratamento anaeróbio de esgotos – um manual para regiões de clima quente*.

VAZOLLER, R. F. (1995). Microbiologia e saneamento ambiental, in: *Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável*, 14p.

VERRIER, D.; MORTIER, B. e ALBAGNAC, G. (1987). Initial adhesion of methanogenic bacteria to polimers. *Biotechnology Letters* Vol. 9 No 10, pp. 735-740

- VERRIER, D.; MORTIER, B.; DUBORGUIER, H. C.; ALBAGNAC, G. (1988).  
Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic  
biofilms. In: HALL, E. R.; HOBSON, P. N. Eds. "ANAEROBIC DIGESTION  
1988". 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION.  
Ed. Pergamon Press, Oxford.
- VOET, D. & VOET, J. G (1995). *Biochemistry*. Second Edition, John Wiley and Sons –  
1357p.
- WIDDEL, F.; PFENNING, N. (1986) Dissimilatory Sulfate or Sulfur-reducing Bacteria.  
in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – vol. 1. 964p
- WILLIAMS, A.G. (1986). Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiol. Ver.* 50:25 – 49  
Apud McINERNEY, M. J. (1988). Anaerobic hidrolisis and fermentation of fats  
and proteins. In: Zehnder, A. J. B. *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. John  
Wiley & Sons, Inc, pp. 381 - 402.
- WILLIAMSON, K. & McCARTY, P. L. (1976), *J. Water Pollut. Contrl. Fed.*, 48, 281,  
Apud DROSTE, R. L. & KENNEDY, K. J. (1986). Sequential substrate utilization  
and effectiveness factor in fixed biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, vol  
XXVIII, pp. 1713 – 1720.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; FORESTI, E. (1996). Cell wash - out and external  
mass transfer resistance in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge reactor.  
*Wat. Res.* vol. 30 No. 10 pp.2435-2439.
- ZAIAT, M. (1996). *Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo  
(RAHLF) para tratamento de águas residuárias*. Tese de Doutorado –

Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia de São Carlos /  
Univesidade de São Paulo, 165p.