

Experimento de mineralização aeróbia para ambientes aquáticos: determinação do número de réplicas

Irineu Bianchini Junior*, Alexandre Luccas Bitar, José Roberto Verani e Alberto Carvalho Peret

Departamento de Hidrobiologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luiz, km 235. Caixa Postal 676, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: irineu@power.ufscar.br

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo testar aspectos metodológicos referentes ao emprego da cinética de consumo de oxigênio dissolvido (OD), como indicador dos processos de mineralização em ecossistemas aquáticos. Foram utilizados 10 frascos (vol. \approx 5L) contendo soluções de glicose (20mg.L^{-1}), preparadas com amostras de água da represa do Monjolinho ($22^{\circ} 00'S$ e $47^{\circ} 54'W$). As soluções foram inicialmente aeradas e durante 33 dias foram determinadas as concentrações de OD e as temperaturas. Os processos anaeróbios foram evitados através de reaerações, quando as concentrações de OD aproximaram-se de $2,0\text{mg.L}^{-1}$. A concentração média de oxigênio gasta para realizar os processos de mineralização foi $12,4\text{mg.L}^{-1}$, com taxas diárias de consumo (k_1) e reoxigenação (k_2) iguais a 7,7% e 3,7%, respectivamente. Com base em análise não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), foi possível verificar que, para a execução de experimentos de mineralização sob as condições adotadas, a utilização de 1 frasco foi suficiente para o acompanhamento da evolução do consumo de OD. No entanto, devido às variações observadas, a utilização de 3 frascos pode ser apontada como ideal.

Palavras-chave: consumo de oxigênio, testes metodológicos, mineralização aeróbia.

ABSTRACT. Aerobic mineralization experiment for aquatic ecosystems: determination of replicas number. This study aimed to test methodological aspects related to the kinetic use of oxygen consumption as an index of mineralization process in aquatic ecosystems. The experiment comprised 10 bottles (5 liters) with water samples from Monjolinho reservoir ($22^{\circ} 00'S$ and $47^{\circ} 54'W$) enriched with glucose (20 mg.L^{-1}). The solutions were previously oxygen saturated and during 33 days the dissolved oxygen concentration and the temperature were registered. The anaerobic processes were avoided by reaerations, when the dissolved oxygen concentrations were near to 2.0 mg.L^{-1} . Concerning to the fitting of the grouping data, the total amount of oxygen used in the mineralization processes was 12.4 mg.L^{-1} , with the daily rates of consumption (k_1) and reaeration (k_2) equals to 7.7 and 3.7%. The non-parametric analysis (Kruskal-Wallis) showed that the use of 1 bottle is sufficient to describe the temporal oxygen consumption evolution through the adopted experimental conditions. However, due to experimental variations, the use of 3 bottles was suggested.

Key words: oxygen consumption, methodological tests, aerobic mineralization.

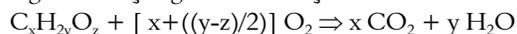
Introdução

Nos ecossistemas aquáticos, a ciclagem do carbono ocorre basicamente pela fotossíntese, quimiossíntese e pela decomposição (aeróbia e anaeróbia; Thurman, 1985). A decomposição é constituída por três eventos: a lixiviação, a fragmentação e o catabolismo. No catabolismo, os detritos são transformados em moléculas pequenas e simples, através de uma reação ou de uma cadeia de reações. Nesse caso, os produtos gerados (orgânicos

ou inorgânicos) poderão ingressar no metabolismo dos decompositores e ser incorporados as suas estruturas. Outros poderão ser convertidos em compostos orgânicos não-celulares (e.g. substâncias húmicas; Swift *et al.* 1979).

Diante da importância da decomposição para o entendimento dos ciclos biogeoquímicos dos ecossistemas aquáticos, vários métodos têm sido propostos para descrever a evolução desse processo. Dentre os mais usuais, citam-se: os rastreamentos de

isótopos radioativos e de elementos inorgânicos e os acompanhamentos: da geração de gases, dos decréscimos das concentrações de compostos orgânicos, da formação de compostos húmicos e da depleção das concentrações de oxigênio dissolvido (OD). Os métodos que envolvem a estimativa da mineralização (conversão de compostos orgânicos em inorgânicos) aeróbia através da depleção das concentrações de OD, muitas vezes, têm como base a seguinte reação geral de oxidação:



O exemplo mais comum dessa reação refere-se à respiração aeróbia da glicose; na qual a oxidação é completa e todos os produtos são inorgânicos. Os estudos cinéticos referentes à decomposição admitem, usualmente, que exista proporcionalidade entre o desaparecimento do substrato e a formação dos produtos. No caso dos processos ocorrerem em condições aeróbias, admite-se, por extensão, que tal proporcionalidade seja válida, também, entre o consumo de oxigênio e a formação de produtos (Stumm e Morgan, 1981; Chapra e Reckhow, 1983; Jørgensen, 1986). Entretanto, no curto prazo, a mineralização pode ser incompleta. Nesse caso, experimentos de degradação de compostos orgânicos simples demonstraram que o rendimento para a formação de biomassa de microrganismos foi, em média, 62%; embora possa ser verificada grande variabilidade (e.g. 26 a 88%; Ramanathan e Gaudy 1972).

Dentre os procedimentos utilizados para avaliar a decomposição, o método de acompanhamento do consumo de OD é um dos mais difundidos, uma vez que os testes de DBO utilizam-se desse princípio. Para que houvesse padronização das respostas, estabeleceram-se nesses testes as condições de preparo e de incubações das amostras (Davis e Cornwell, 1991). Por outro lado, os consumos de oxigênio podem ser também utilizados para avaliar os efeitos de condicionantes ambientais (e.g. temperatura e concentrações de nutrientes) sobre a mineralização. Nesse caso, experimentos projetados à semelhança dos ensaios de DBO têm sido utilizados para descrever as influências de fatores bióticos e abióticos na ciclagem de matéria orgânica de sistemas aquáticos (Brum *et al.*, 1999; Farjalla *et al.*, 1999; Antonio e Bianchini Jr., 2002).

Experimentos de mineralização com vários tipos de recursos indicaram que os parâmetros cinéticos de consumo de oxigênio alteraram-se em função de características qualitativas dos substratos. Tais experimentos sugeriram, ainda, a ocorrência de variações nos coeficientes estequiométricos que tratam do consumo de oxigênio por átomo de

carbono oxidado (Cunha e Bianchini Jr., 1998; Antonio *et al.*, 1999; Bitar e Bianchini Jr., 2002; Cunha-Santino *et al.*, 2002). Em termos quantitativos, experimentos efetuados com glicose indicaram que o incremento da velocidade de mineralização pode também ser devido ao aumento da concentração de substrato, conforme o modelo proposto por Michaelis-Menten, bem como sugeriram que a alteração da concentração de substrato pode interferir no rendimento dos processos de formação de biomassa de microrganismos (Bitar e Bianchini Jr., 1994). Com base no consumo de oxigênio, como indicador dos processos aeróbios de decomposição em ecossistemas aquáticos, esse trabalho visou determinar o número de frascos necessários para experimentos de mineralização aeróbia.

Material e métodos

Para a execução do experimento foram coletadas, no reservatório do Monjolinho, Estado de São Paulo (22°00'S e 47°54'W), duas amostras de, respectivamente, 45 e 5 litros de água. As amostras foram levadas ao laboratório e filtradas em lã de vidro. Foram utilizados 10 frascos (vol. ≈ 5L), aos quais se adicionaram soluções de glicose preparadas com as amostras de água (concentração: 20mg.L⁻¹). Os frascos referentes à primeira amostragem (45L) foram numerados de 1 a 9. O frasco 10 conteve a amostra da segunda coleta, que foi efetuada 2 horas após a primeira. Esse procedimento foi necessário pois a quantidade de amostra obtida na primeira coleta não foi suficiente.

Em seguida, as soluções foram aeradas (≈ 1 hora) para elevar as concentrações de OD próximas à saturação. Durante 33 dias, os frascos foram mantidos fechados, no escuro e em temperatura ambiente. Periodicamente, foram determinadas, com oxímetro, as concentrações de OD e a temperatura das soluções. Os processos desenvolveram-se sob temperatura média de 22,9°C (± 1,3°C). A ocorrência de anaerobiose foi evitada devido à reaeração das soluções, quando as concentrações de OD aproximaram-se de 2,0mg.L⁻¹. Esse processo induzido de reaeração constituiu-se em um procedimento controlado, pois foi possível determinar, ao seu final, a quantidade adicionada de oxigênio. Os argumentos que tratam da reoxigenação como um processo interferente (na apresentação da Eq. 4) não incluem esse procedimento.

Considerando que, na mineralização, os consumos de oxigênio seguem uma cinética de primeira ordem (Jørgensen, 1986; Antonio e Bianchini Jr., 2003) é possível descrever esses processos de acordo com as seguintes equações:

1º) Depleção das concentrações de oxigênio dissolvido.

$$\frac{dC_{DO}}{dt} = -k_1 C_{DO} \dots\dots\dots \text{(Equação 1)}$$

em que:

C_{DO} = variação temporal da concentração de OD, mg.L⁻¹
 k_1 = coeficiente de consumo de OD, dia⁻¹

2º) Consumo de oxigênio.

$$\frac{dC_{OC}}{dt} = k_1 C_{DO} - k_2 C_{OC} \dots \text{(Equação 2)}$$

em que:

C_{OC} = evolução temporal do consumo de OD, mg.L⁻¹
 k_2 = coeficiente de reeração, dia⁻¹

Se a reeração devido à manipulação das amostras for evitada, a exemplo dos procedimentos adotados nos testes de DBO (nos quais as garrafas são abertas somente no último dia), admite-se que $k_2 = 0$. Nesse caso, C_{OC} pode ser considerada como equivalente a DBO e a integração analítica da Eq. 2 resulta em:

$$OC = L \times (1 - e^{-k_1 t}) \dots\dots\dots \text{(Equação 3)}$$

em que:

L = consumo total de oxigênio, mg.L⁻¹

Por outro lado, caso os processos de reeração não sejam controlados (devido às aberturas periódicas dos frascos para as determinações das concentrações de OD e pela agitação magnética das amostras, durante as quantificações com o uso de eletrodo) a integração analítica da Equação 2 resulta em um modelo cinético (Eq. 4) similar ao clássico proposto por Streeter e Phelps (1925), para descrição das variações longitudinais das concentrações de OD em rios.

$$OC = L \times \frac{k_1}{k_2 - k_1} \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \dots \text{(Equação 4)}$$

em que:

OC = evolução temporal do consumo acumulado de OD, mg.L⁻¹

L = consumo total de oxigênio, mg.L⁻¹

k_1 = coeficiente de consumo de oxigênio, dia⁻¹

k_2 = coeficiente de reeração, dia⁻¹

De posse dos resultados (evoluções temporais de consumo de OD), efetuou-se uma análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos de dados de cada frasco (Siegel, 1975). Em seguida, as variações temporais de consumo de oxigênio foram ajustadas (por meio de regressão não-linear) ao modelo cinético proposto

(Eq. 4). A partir do agrupamento dos resultados, de forma crescente e ao acaso (através de sorteio), esses foram novamente ajustados ao modelo (Eq. 4), através dos quais foram obtidos os coeficientes de consumo de oxigênio (k_1) e de reoxigenação (k_2) dos conjuntos dos resultados. Com base nas relações k_1/k_2 dos resultados agrupados, comparou-se a variação dos valores dessas razões com o número de garrafas, tendo em vista verificar a reprodutibilidade do método (sugerida pelo teste de Kruskal-Wallis) e identificar a quantidade mínima de frascos necessária para a execução de um ensaio de mineralização, sob as condições experimentais adotadas.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise de Kruskal-Wallis. Diante do nível de significância obtido, observa-se que houve diferença entre os resultados de média de “rank”, quando considerados os resultados de todos os frascos simultaneamente ($p < 0,05$). Portanto, ao considerar os 10 frascos rejeitou-se a hipótese inicial (H_0) de que houve homogeneidade entre os dados. No entanto, ao reaplicar esse teste (3 vezes) a partir da retirada de grupos com valores de médias de “rank” consideradas discrepantes (grupo 10, grupo 7 e grupos 10 e 7), verificou-se que, ao excluir apenas os dados referentes ao grupo 10 (resultados do frasco 10), já se obteve a aceitação da hipótese H_0 ($p \geq 0,05$), levando-se em consideração a similaridade significativa entre os demais resultados (referentes aos frascos de 1 a 9).

Tabela 1. Análise de Kruskal-Wallis dos grupos de resultados.

Frasco nº	Tamanho Amostral	Média do “Rank”
1	19	63,90
2	19	98,29
3	19	95,76
4	19	77,74
5	19	99,20
6	19	99,55
7	19	112,55
8	19	74,61
9	19	91,05
10	19	142,40

Teste estatístico = 27,01
 Nível de significância = 0,0014

As indicações previstas pelo teste de Kruskal-Wallis corroboram a evidência obtida das comparações das cinéticas de consumo de oxigênio (Figuras 1 e 2) a partir das quais foi possível verificar a diferenciação de escala dos resultados do frasco 10 frente aos demais. De acordo com esses resultados, inferiu-se que os procedimentos metodológicos adotados foram sensíveis o suficiente para acusar a presença de uma amostra provavelmente distinta.

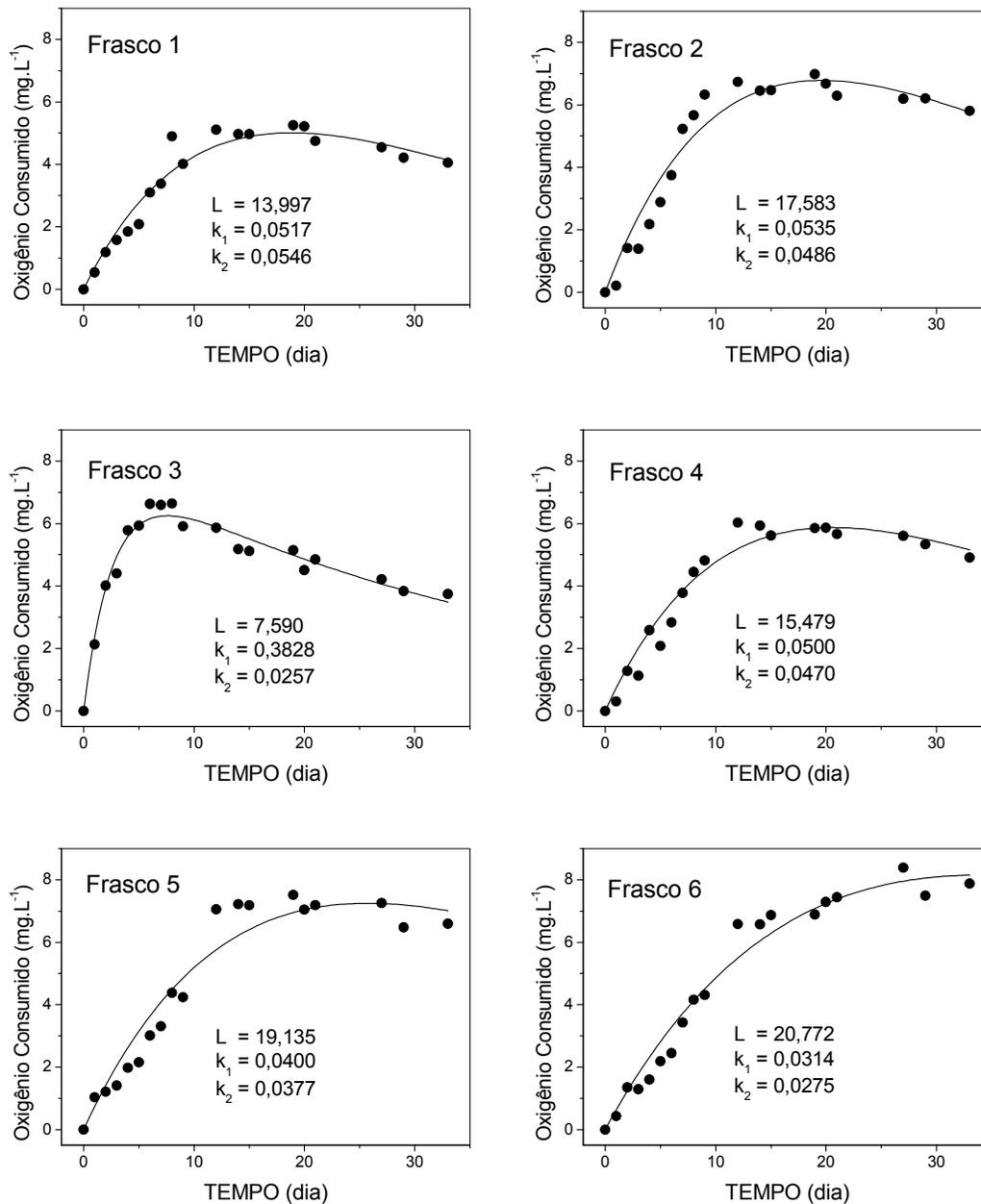
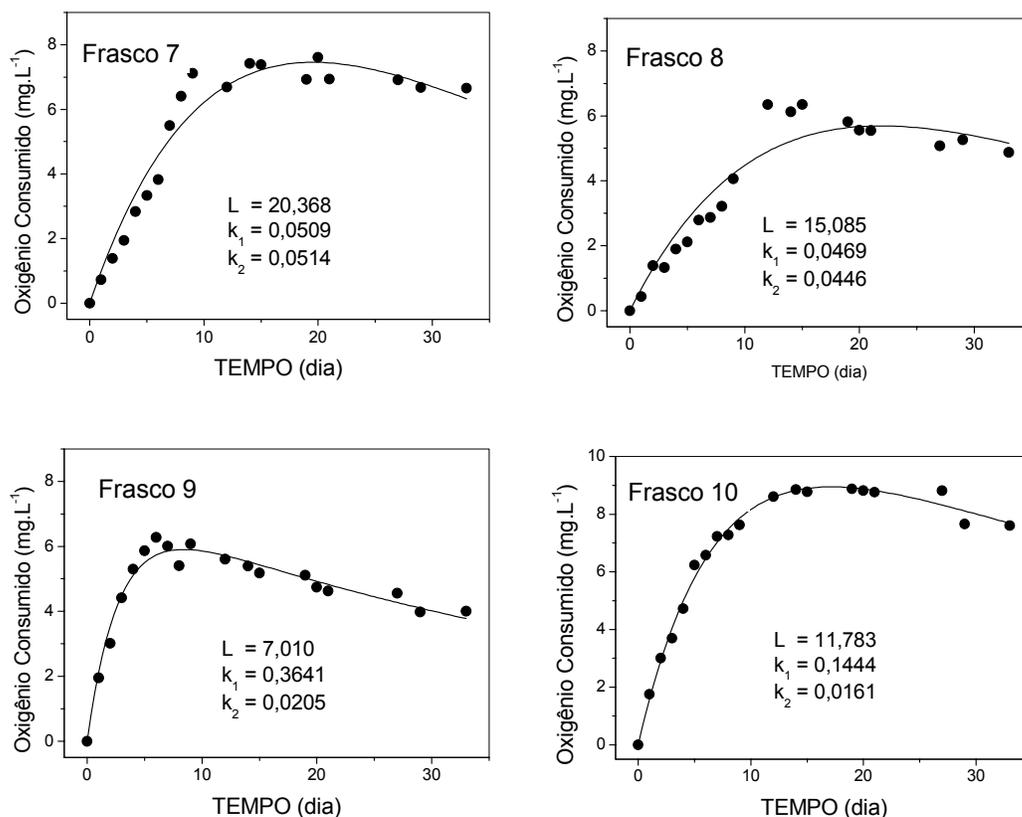


Figura 1. Cinéticas de consumo de oxigênio durante os processos de mineralização nos frascos 1 a 6.

Do ponto de vista cinético (Figuras 1 e 2,) nota-se que houve uma tendência geral de consumo de oxigênio mais acentuado nas etapas iniciais. Com o decorrer do tempo, verificou-se um gradual decréscimo na utilização do OD e, nas etapas finais, foi possível registrar o predomínio dos processos de reaeração (devido às manipulações das amostras), pelos decréscimos na quantidade de oxigênio consumido. Descartando os

resultados referentes ao frasco 10 e agrupando os demais, determinou-se, através do ajuste ao modelo adotado (Equação 4), que a quantidade total teórica de oxigênio consumido foi de $12,4\text{mg.L}^{-1}$, a taxa teórica diária de consumo de oxigênio foi de 7,7%, enquanto que a de reoxigenação foi de 3,7%. Convém assinalar que esses valores foram também obtidos ao ajustar os valores médios de consumo de OD desses 9 frascos (Figura 3A).



Figuras 2. Cinéticas de consumo de oxigênio durante os processos de mineralização nos frascos 7 a 10.

Os resultados (Figuras 1 e 2) permitiram constatar, também, que houve boa aderência dos pontos experimentais ao modelo proposto, indicando a adequação das equações sugeridas. Nesse contexto, ressalta-se a necessidade da inclusão do termo de reoxigenação (k_2) nas estimativas de consumo de oxigênio, caso sejam adotados procedimentos metodológicos similares aos utilizados. No que se refere à dispersão dos resultados, em relação ao modelo (Eq. 4), é possível que um dos fatores responsáveis tenha sido a falta de controle da temperatura. Nesse caso, pelos resultados obtidos (Figura 3B) foi possível notar a acentuada oscilação dessa variável durante todo o ensaio. Ainda sobre a dispersão dos resultados experimentais, em relação aos ajustes (valores teóricos), deve-se considerar que o consumo de oxigênio provavelmente ocorre, simultaneamente, por meio de várias reações (e.g. nitrificação, formação de sulfatos e oxidação dos compostos de carbono), que evoluem temporalmente de modo diferenciado. Todos esses processos, por sua vez, foram agrupados por um modelo cinético global que considera somente o consumo de oxigênio, independentemente das rotas bioquímicas e suas épocas de ocorrência.

Na Tabela 2 são apresentados os coeficientes de consumo, de reaciação e a relação entre k_1/k_2 referentes aos ajustes dos resultados agrupados (por amostragem aleatória) à cinética de mineralização representada pela Equação 4. A partir desses resultados foi possível verificar que, embora o teste de Kruskal-Wallis tenha acusado similaridade entre as evoluções de consumo de oxigênio (frascos 1 a 9), sugerindo que ensaios dessa natureza possam ser efetuados com apenas uma garrafa, as variações dos coeficientes e da razão k_1/k_2 , verificadas em função do agrupamento de resultados, apontam para a convergência dos valores dos parâmetros (k_1 e k_2) a partir do agrupamento dos resultados de 3 frascos (Tabela 2; Figura 3C). Além disso, evidenciam que experimentos dessa natureza devam utilizar 3 repetições por amostra. Convém esclarecer que k_1 e k_2 são coeficientes que apresentam interação numérica, o que significa que na função representada pela equação 4, quando um deles apresenta incremento de valor, ocorre, obrigatoriamente, decréscimo no valor do outro. Diante dessa interatividade, utilizou-se também a razão k_1/k_2 para a confirmação do teste de Kruskal-Wallis.

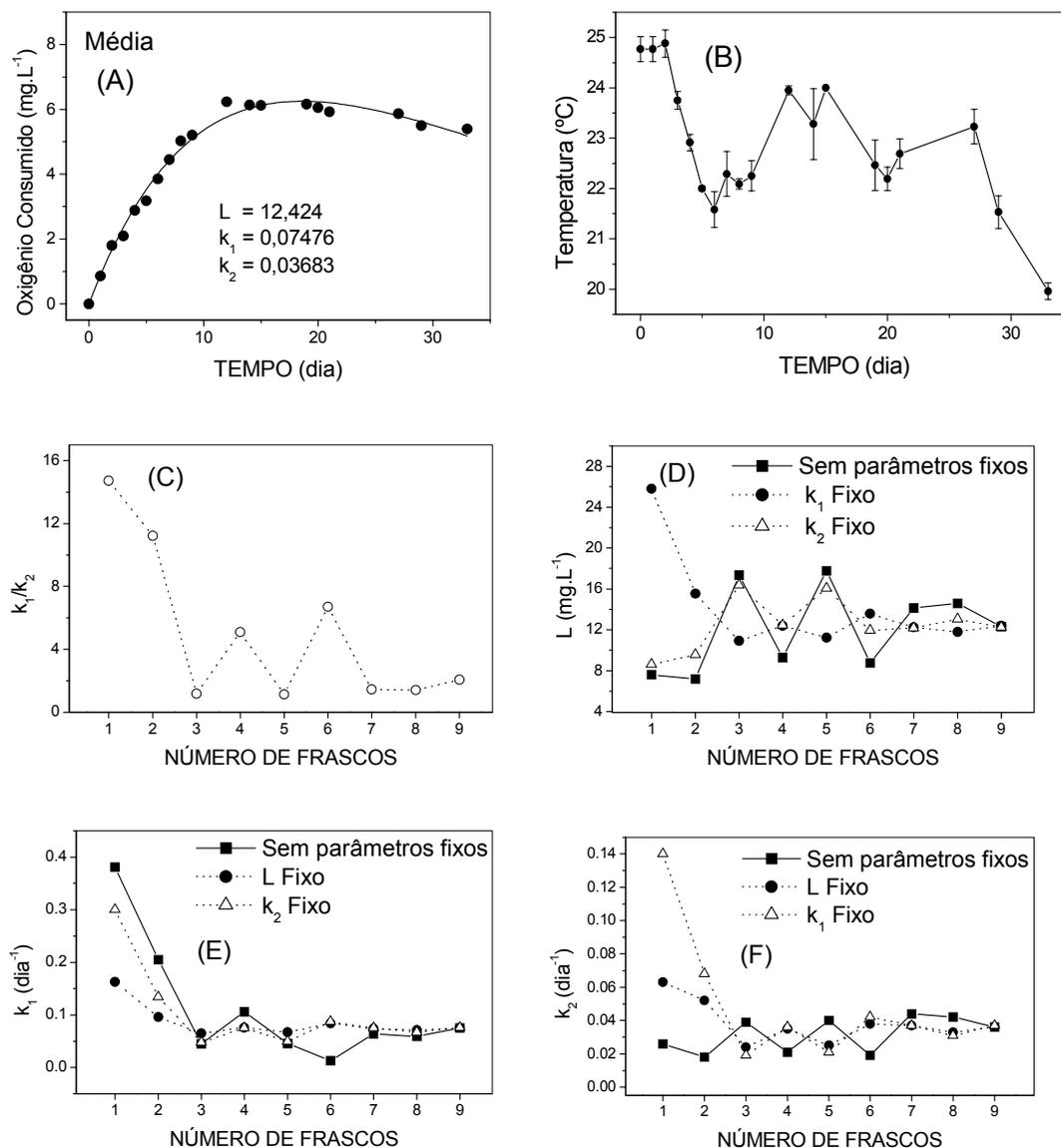


Figura 3. Cinética dos valores médios de consumo de oxigênio durante os processos de mineralização (A) e variação temporal da temperatura nos frascos (B). Alterações da razão k_1/k_2 (C) e dos demais parâmetros (L , k_1 e k_2) em função do agrupamento dos resultados (D, E e F).

As convergências dos valores dos parâmetros L , k_1 e k_2 , a partir da utilização dos resultados de 3 frascos, puderam ser confirmadas através das repetições dos ajustes dos resultados agrupados à equação 4, considerando (fixando), em separado, 3 situações: 1ª) que a concentração de OD necessária para a efetivação dos processos de mineralização (L), de todos os frascos, fosse de $12,4\text{mg.L}^{-1}$; 2ª) que o coeficiente de consumo de oxigênio (k_1) tenha sido,

em todos os frascos, $0,075 \text{ dia}^{-1}$ e 3ª) que o coeficiente de reoxigenação k_2 , referente à manipulação das amostras, no decorrer do experimento, tenha sido $0,036 \text{ dia}^{-1}$, para todos os frascos. A escolha desses valores, para a fixação dos parâmetros, tem como base o ajuste dos resultados agrupados dos frascos 1 a 9 e/ou o ajuste dos resultados médios desses frascos (Figura 3A).

Tabela 2. Razão k_1/k_2 e taxas obtidas a partir do ajuste cinético dos resultados, em função do agrupamento aleatório dos dados.

Agrupamento dos Frascos	k_1 (dia ⁻¹)	k_2 (dia ⁻¹)	k_1/k_2
3	0,3807	0,0259	14,72
3 e 4	0,2051	0,0183	11,21
6,7 e 8	0,0454	0,0386	1,18
1,6,7 e 9	0,1059	0,0208	5,09
2,5,6,7 e 8	0,0456	0,0405	1,13
2,3,6,7,8 e 9	0,1285	0,0191	6,72
1,2,3,4,5,7 e 8	0,0641	0,0440	1,46
1,2,3,4,5,6,7 e 8	0,0593	0,0416	1,42
1,2,3,4,5,6,7,8 e 9	0,0755	0,0364	2,07

Desses novos ajustes, pode-se notar também que, no geral, o conhecimento prévio de um dos parâmetros diminui a variabilidade dos demais, e a convergência dos valores, em função do número de garrafas, tende a ser mais rápida (Figuras 3D, 3E e 3F). Por exemplo, ao assumir que a taxa de reoxigenação (k_2) inerente aos procedimentos experimentais adotados seja 0,036 dia⁻¹, isso fez com que a convergência dos valores de k_1 já fosse praticamente alcançada a partir da utilização de 2 frascos (Figura 3E). Além disso, fez que houvesse uma diminuição nas amplitudes de variações de L e k_1 (Figuras 3D e 3E), em função do número de garrafas, quando comparadas com suas respectivas dispersões, quando nenhum parâmetro foi previamente fixado.

Conclusão

De acordo com os procedimentos metodológicos utilizados, os resultados indicaram que os experimentos de mineralização podem ser efetuados com apenas uma garrafa por amostra. No entanto, devido à possível variabilidade amostral, sugeriu-se o emprego de 3 garrafas; a utilização de mais de 3 frascos foi considerada desnecessária. Para a descrição do consumo de OD sob as condições adotadas, os efeitos das reações das amostras devem ser neutralizados, incluindo-se o coeficiente k_2 no equacionamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento parcial desse trabalho (Processo nº 91/1303-3).

Referências

ANTONIO, R.M. *et al.* Consumo de oxigênio na mineralização de folhas, galhos, cascas e serapilheira. *Acta Limnológica Brasiliensis*, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 1-16, 1999.

ANTONIO, R.M.; BIANCHINI JR., I. The effect of temperature on the glucose cycling and oxygen uptake

rates in the Infernão lagoon water, state of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 2, p. 291-296, 2002.

ANTONIO, R.M.; BIANCHINI JR., I. Methodological tests of a heterotrophy index for aquatic ecosystems. *Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 63, n. 4, 2003.

BITAR, A.L.; BIANCHINI JR., I. Efeito do teor de matéria orgânica dissolvida sobre as taxas de seu processo de mineralização. In: I SEMINÁRIO: QUALIDADE DE ÁGUAS CONTINENTAIS NO MERCOSUL, 1994, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: ABRH n. 2, 1994. p. 311-329.

BITAR, A.L.; BIANCHINI JR., I. Mineralisation assays of some organic resources of aquatic systems. *Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 62, n.4A, p. 557-564, 2002.

BRUM, P.R. *et al.* Aspects of uptake of dissolved oxygen in Cabiúnas and Imboassica lagoons (Macaé, RJ). *Brazil. Arch. Biol. Tech.*, Curitiba, v.42, n.4, p. 433-440, 1999.

CUNHA, M.B.; BIANCHINI JR., I. Mineralização aeróbia de *Cabomba piauhyensis* e *Scirpus cubensis*. *Acta Limnológica Brasiliensis*, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 81-91, 1998.

CUNHA-SANTINO, M.B. *et al.* F. Aerobic and anaerobic degradation of tannic acid on water samples from Monjolinho reservoir (São Carlos, SP, Brazil). *Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 62, n. 4A, p. 585-590, 2002.

CHAPRA, S.C.; RECKHOW, K.H. *Engineering approaches for lake management*. v. 2: mechanistic modeling. Woburn: Butterworth/Ann Arbor, 1983.

DAVIS, M.L., CORNWELL, D.A. *Introduction to environmental engineering*. New York: McGraw-Hill, 1991.

FARJALLA, V.F. *et al.* Uptake of oxygen in the initial stages of decomposition of aquatic macrophytes and detritus from terrestrial vegetation in a tropical coastal lagoon. *Acta Limnológica Brasiliensis*, Botucatu: v. 11, n. 2, p. 185-193, 1999.

JØRGENSEN, S.E. *Fundamentals of Ecological Modelling*. Developments in Environmental Modelling, 9. Amsterdam: Elsevier, 1986.

RAMANATHAN, M; GAUDY JR., A.F. Studies on sludge yield in aerobic systems. *J. Water. Pollut. Control Fed.* v. 44, p. 441-450, 1972.

SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica* (para as Ciências do Comportamento). São Paulo: Mc Graw-Hill, 1975.

STUMM, W.; MORGAN, J.J. *Aquatic Chemistry*. New York: Wiley/Interscience, 1981.

STREETER, H.W.; PHELPS, E.B. A study of the pollution and natural purification of the Ohio river. U.S. *Public Health Serv. Bull.*, Washington, DC, p.146, 1925.

SWIFT, M.J. *et al.* *Studies in Ecology: decomposition in terrestrial ecosystems*. Oxford: Blackwell, 1979.

THURMAN, E.M. *Organic geochemistry of natural waters*. Dordrecht: Nijhoff/Junk Po., 1985.

Received on May 20, 2003.

Accepted on October 20, 2003.