Campus de São Carlos

**Estudo da metodologia do teste de atividade
metanogênica específica**

Jorge Adílio Penna

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Campos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

JORGE ADÍLIO PENNA

ESTUDO DA METODOLOGIA DO TESTE DE
ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA

Volume I

DEDALUS - Acervo - EESC

31100017306

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Hidráulica e saneamento.

Área de Concentração: Hidráulica e Saneamento.

Orientador:
José Roberto Campos

São Carlos

1994

Class.	Tese - EESC
Cutt.	4395
	V. 1
Tombo	109/94

hidraulica

st 0742 306

À minha esposa Ângela e a
meus filhos Daniel e
Leonardo pelo incentivo e
paciência

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Roberto Campos pelo incentivo e orientação.

À Professora Rosana F. Vazoller pela dedicação e profissionalismo com que nos orientou durante toda a realização desse trabalho.

À Professora Rita de Cássia Silva pela amizade e pelo grande auxílio nos ensaios de laboratório.

Às Engenheiras Valéria del Neri e Viviana Maria Zanta que desenvolveram conosco as análises cromatográficas desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos/USP pela dedicação e amizade.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- pelos recursos destinados à essa pesquisa.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior - através do seu Programa Institucional de Capacitação de Docentes (PICD) pela oportunidade que nos concedeu de realizar esse programa de doutorado.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	I
Lista de Figuras.....	VI
Lista de Cromatogramas.....	XII
Lista Abreviaturas.....	XIII
Resumo.....	XIV
"Abstract".....	XV
 1 - INTRODUÇÃO	 01
 2 - OBJETIVOS	 05
 3 - REVISÃO DA LITERATURA	 06
3.1 - A Atividade Metanogênica Específica	06
3.1.1 - Considerações Preliminares	06
3.1.2 - Conceito e Formas de Expressão de Medida da Atividade Metanogênica	12
3.2 - Metodologias para Determinação da Atividade Metanogênica Específica	16
3.2.1 - Considerações Gerais	16
3.2.2 - A Biomassa para os Testes	18
3.2.3 - Os Substratos para os Testes	21
3.2.4 - As Medidas de Metano Durante os Testes	26
3.2.5 - Critérios para o Cálculo da Atividade Metanogênica Específica	28
3.2.6 - Descrição das Metodologias para o Teste de Atividade Metanogênica Específica	29
3.2.6.1 - O Trabalho de Valcke e Verstraete (1983)	30
3.2.6.2 - O Trabalho de Willem de Zeeuw (1984)	35
3.2.6.3 - O Trabalho de Dolfing e Bloemen (1985)	47
3.2.6.4 - O Trabalho de James, Chernicharo e Campos (1990)	54

3.2.6.5	- Outras Metodologias Propostas para o Teste de Atividade Metanogênica	61
3.3	- Análise Crítica das Metodologias de Medida da Atividade Metanogênica Específica Apresentadas	70
3.3.1	- Análise Crítica	70
3.4	- Determinação de Ácidos Voláteis e Composição de Biogás por Cromatografia em Fase Gasosa	73
3.4.1	- Metodologias para Determinação de Ácidos Voláteis por Cromatografia a Gás	75
3.4.2	- Metodologias para Determinação da Composição dos Gases da Biodigestão por Cromatografia a Gás ..	80

4 - MATERIAIS E MÉTODOS 90

4.1	- Considerações	90
4.2	- Materiais e Métodos Utilizados para o Teste de Atividade Metanogênica Específica	90
4.2.1	- Considerações Preliminares	90
4.2.2	- Materiais e Condições de Ensaio	92
4.2.3	- Procedimentos para Realização do Teste	96
4.3	- Análises de Ácidos Voláteis por Cromatografia Gasosa	99
4.3.1	- Identificação e Quantificação dos Ácidos no Cromatograma	100
4.3.2	- Procedimentos para a Análise Cromatográfica dos Ácidos Voláteis	102
4.4	- Análises de Composição do Biogás por Cromatografia Gasosa	104
4.4.1	- Identificação e Determinação da Composição Percentual do Biogás	105
4.4.2	- Procedimentos para as Análises Cromatográficas do Biogás	107
4.5	- Definição da Metodologia para Determinação da Concentração de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) do Lodo	109
4.5.1	- Considerações	109

4.5.2	- Procedimentos para Determinação da Concentração de SSV	109
4.6	- Determinação dos Volumes de Metano	111
4.6.1	- Procedimentos Empregados para o Cálculo da Atividade Metanogênica Específica e da Fase "lag"	112
4.7	- Resumo da Metodologia Utilizada no Desenvolvimento do Estudo do Teste de Atividade Metanogênica Específica	123

5 - RESULTADOS 132

5.1	- Considerações sobre Resultados da Pesquisa ...	132
5.2	- Resultados Preliminares	133
5.2.1	- Otimização das Condições de Separação dos Ácidos Voláteis nas Análises Cromatográficas	133
5.2.2	- Quantificação dos Ácidos Voláteis	134
5.2.3	- Medidas de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) dos Lodos	144
5.2.4	- Medidas de Volumes de Metano	144
5.2.5	- Caracterização das Amostras de Lodo e das Águas Residuárias Utilizadas como Substrato.....	148
5.2.5.1-	Caracterização das Amostras de Lodo de Digestor de Esgoto Doméstico	148
5.2.5.2-	Caracterização das Amostras dos Reatores de Manta de Lodo	148
5.3	- Resultados dos Testes de Atividade Metanogênica Específica	156

6 - DISCUSSÃO 434

6.1	- 1º Bloco de Ensaios.....	434
6.2	- 2º Bloco de Ensaios.....	437
6.3	- 3º Bloco de Ensaios.....	439
6.4	- 4º Bloco de Ensaios.....	440
6.5	- 5º Bloco de Ensaios.....	443
6.6	- 6º Bloco de Ensaios.....	446

6.7	-	7º Bloco de Ensaaios	456
6.8	-	8º Bloco de Ensaaios	458
6.9	-	9º Bloco de Ensaaios	462
6.10	-	10º Bloco de Ensaaios	468
6.11	-	11º Bloco de Ensaaios	473
6.12	-	12º Bloco de Ensaaios	480
6.13	-	13º Bloco de Ensaaios	483
6.14	-	14º Bloco de Ensaaios	484
6.15	-	Discussão Geral dos Resultados	485
6.15.1	-	Análises de Biogás e Ácidos Voláteis por Cromatografia Gasosa	485
6.15.2	-	Medidas de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e de Volumes de Metano	487
6.15.3	-	A Relação entre as Quantidades de Substrato e Biomassa para o Teste	489
6.15.4	-	Os Substratos para o Teste de Atividade Metanogênica	490
6.15.5	-	A Simplificação dos Testes	492
6.15.6	-	A Fase "Lag" e o Crescimento da Biomassa Durante os Testes	494
7 - CONCLUSÕES			500
8 - RECOMENDAÇÕES			509
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS			510

Lista de cromatogramas

Cromatograma 01 -	Identificação dos ácidos voláteis no cromatograma, através da sequência de eluição	103
Cromatograma 02 -	Sequência de eluição do biogás na coluna de Porapak Q	107
Cromatograma 03 -	Análise de biogás utilizada nos cálculos da tabela 20	109
Cromatograma 04 -	Análise de biogás antes da passagem pela solução de hidróxido de sódio	146
Cromatograma 05 -	Análise de biogás após a passagem pela solução de hidróxido de sódio	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Conteúdo do F ₄₂₀ em culturas metanogênicas puras	09
Tabela 02 - Atividades específicas máximas de bactérias metanogênicas acetoclásticas de algumas culturas axênicas e de lodos metanogênicos crescidos em acetato	31
Tabela 03 - Produção de metano (num período de 24 horas) de lodo de reator de fluxo ascendente, alimentado com acetato de sódio, relacionada a diferentes concentrações de lodo e carga (Valcke & Verstraete, 1983)	33
Tabela 04 - Influência do período de armazenamento do lodo de digestor de esgoto à 4°C na fase "lag" e na sua atividade metanogênica	39
Tabela 05 - Influência do modo de agitação na duração da fase "lag" para diferentes ácidos voláteis em reatores descontínuos	40
Tabela 06 - Influência do modo de agitação e do pH inicial na duração da fase "lag" em reatores descontínuos	41
Tabela 07 - Influência da concentração inicial de substrato na duração da fase "lag"	43
Tabela 08 - Fase "lag" em reatores descontínuos para uma primeira e uma segunda alimentação	43
Tabela 09 - Efeito do pH inicial na duração da fase "lag" em reatores descontínuos	44

Tabela 10 - Efeito da concentração de amônia na duração da fase "lag" em reatores descontínuos	45
Tabela 11 - Influência do sulfeto como sulfeto de potássio, ou sulfeto produzido através da redução de sulfato na duração da fase "lag"	45
Tabela 12 - Atividades metanogênicas de vários grupos metabólicos de bactérias anaeróbias de importância em ecossistemas metanogênicos ...	48
Tabela 13 - Influência de NH_4Cl na medida da atividade metanogênica de lodo granular	50
Tabela 14 - Atividades metanogênicas de biomassa cultivadas em reatores anaeróbios utilizados no tratamento de diversas águas residuárias	53
Tabela 15 - Comparação dos valores de atividade metanogênica com Hidrogênio, Acetato e Hidrogênio mais Acetato da biomassa cultivada em vários substratos	54
Tabela 16 - Resumo das metodologias do teste de atividade metanogênica específica desenvolvidas por diversos pesquisadores	67
Tabela 17 - Condições para análise de ácidos voláteis por cromatografia a gás	85
Tabela 18 - Condições para análise de gases da biodigestão por cromatografia a gás	88
Tabela 19 - Valores da resposta térmica relativa (RTR) para alguns gases	106
Tabela 20 - Cálculo das Porcentagens Reais de Gases da Biodigestão Referentes ao Cromatograma 03 ..	106

Tabela 21 - Resultados Referentes ao 1º Exemplo Ilustrativo de Cálculo da Atividade Metanogênica Específica Baseada na Técnica de de Zeeuw (1984)	115
Tabela 22 - Resultados referentes ao 2º exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de de Zeeuw (1984)	117
Tabela 23 - Resultados referentes ao exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989)	121
Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica	124
Tabela 25 - Caracterização das Amostras de Lodo de Esgoto Doméstico em Digestão	151
Tabela 26 - Caracterização das Amostras de Lodo dos Reatores de Manta de Lodo	153
Tabela 27 - Caracterização dos Reatores que Forneceram amostras de lodo para a pesquisa	155
Tabela 28 - Caracterização das Águas Residuárias Utilizadas como Substratos para os Testes de Atividade Metanogênica	156
Tabela 29 - Resultado dos Testes Referentes ao 1º Bloco de Ensaios	159
Tabela 29.a - Resultados de Análises da concentração de Biogás em Testes do 1º Bloco de Ensaios	160
Tabelas 30.a a 30.d - Resultados dos Testes Referentes ao 2º Bloco de Ensaios	167

Tabela 31 - Resultados dos Testes Referentes ao 3º Bloco de Ensaaios	188
Tabela 32 - Resultados dos Testes Referentes ao 4º Bloco de Ensaaios	196
Tabela 33 - Resultado dos Testes Referentes ao 5º Bloco de Ensaaios	202
Tabelas 34.a a 34.h - Resultados dos Testes Referentes ao 6º Bloco de Ensaaios	212
Tabelas 35.a a 35.e - Resultados dos Testes Referentes ao 7º Bloco de Ensaaios	261
Tabelas 36.a a 36.e - Resultados dos Testes Referentes ao 8º Bloco de Ensaaios	290
Tabelas 37.a a 37.e - Resultados dos Testes Referentes ao 9º Bloco de Ensaaios	319
Tabelas 38.a a 38.e - Resultados dos Testes Referentes ao 10º Bloco de Ensaaios	347
Tabelas 39a a 39e - Resultados dos Testes Referentes ao 11º Bloco de Ensaaios	377
Tabelas 40.a a 40.e - Resultados do Testes Referentes ao 12º Bloco de Ensaaios	409
Tabela 41 - Resultados do Testes Referentes ao 13º Bloco de Ensaaios	419
Tabelas 42.a e 42.b - Resultados dos Testes Referentes ao 14º Bloco de Ensaaios	426

Tabela 43 - Resultados Comparativos entre os Valores de Atividade Metanogênica para os Testes com as Metodologias desse Estudo e Dubourguier apud Vazoller (1989)	482
Tabela 44 - Resultados de Testes de Atividade Metanogênica com lodos após armazenamento	484
Tabela 45 - Comparação entre as Quantidades de Substrato e a Atividade Específica para os lodos Estudados, Frente a uma Quantidade Fixa de Biomassa ...	490
Tabela 46 - Resultados Comparativos da Duração da Fase "lag" em Função da Forma de Agitação dos Teste	495
Tabela 47 - Resultados Comparativos da Duração da Fase "lag" em Função do Armazenamento do lodo ...	496
Tabela 48 - Resultados Comparativos da Duração da Fase "lag" em Função da Atividade Metanogênica do lodo	497
Tabela 49 - Variação da Biomassa em Função da Natureza dos Substratos Durante os Testes com os Lodos Pesquisados	499

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Produção acumulada de metano por unidade de biomassa obtida em testes de atividade com três diferentes amostras de lodo digestor de esgoto doméstico (de Zeeuw, 1984) 13
- Figura 02 - Degradação de acetato, propionato e butirato em testes de atividade metanogênica com lodo de digestor de esgoto do tipo F5, descrito na Tab.1, Cap.4 (de Zeeuw, 1984) 25
- Figura 03 - Degradação de acetato, propionato e butirato em testes de atividade metanogênica com o lodo de digestor de esgoto do tipo E5, descrito na Tab.1, Cap.4 (de Zeeuw, 1984) 25
- Figura 04 - Conjunto reator - retentor de CO₂ - gasômetro utilizado nos testes de atividade metanogênica (Valcke & Verstraete, 1983) 32
- Figura 05 - Linearidade da produção de CH₄ em 30h. Concentração inicial do lodo: 4,4 gSSV/l (Valcke & Verstraete, 1983) 33
- Figura 06 - Linearidade da produção de CH₄ em 30h. Concentração de lodo : 6,1 gSSV/l (Valcke & Verstraete, 1983) 34
- Figura 07 - Conjunto reator - filtro de soda - gasômetro usado por de Zeeuw em seus testes de atividade (de Zeeuw, 1984) 36
- Figura 08 - Relação entre a fase "lag" e a atividade metanogênica para 9 amostras de lodo de digestor de esgoto (x) sendo uma delas

	ensaiada com quatro concentrações diferentes de lodo (+) (de Zeeuw, 1984)	38
Figura 09 -	Influência da agitação na fase "lag" da produção de gás na digestão de propionato (de Zeeuw, 1984)	40
Figura 10 -	Efeito do contato do ar na taxa de produção de metano em reatores descontínuos (de Zeeuw, 1984)	46
Figura 11 -	Efeitos de diferentes quantidades de biomassa na taxa de produção de metano com acetato e hidrogênio e dióxido de carbono (Dolfing & Bloemen, 1985)	49
Figura 12 -	Influência da concentração de NaCl nos valores da atividade metanogênica de lodos granulados (Dolfing & Bloemen, 1985)	51
Figura 13 -	Efeito do pH na atividade metanogênica de lodo granular (Dolfing & Bloemen, 1985) ...	52
Figura 14 -	Relação entre a produção teórica de metano esperada e a quantidade medida em testes de atividade (James et al, 1990)	60
Figura 15 -	Variação da atividade metanogênica do lodo com a sua posição de coleta no reator (James et al, 1990)	60
Figura 16 -	Relação entre a carga orgânica aplicada e a atividade metanogênica (James et al, 1990) ...	61
Figura 17 -	Variação da eficiência da coluna com a velocidade do gás de arraste (Ciola, 1985)	74

Figura 18 -	Cromatograma com a separação dos ácidos voláteis obtido por Andrews et al (1964) ..	77
Figura 19 -	Cromatograma de ácidos voláteis obtido por Vieira & Souza (1985)	78
Figura 20 -	Cromatograma de ácidos voláteis obtido por Unger et al (1977)	79
Figura 21 -	Cromatograma com a separação dos gases da biogestão obtido por Vieira & Souza (1985) ...	82
Figura 22 -	Cromatograma de biogás obtido por Unger et al (1977)	84
Figura 23 -	Conjunto reator - gasômetro - recipiente coletor empregado nos testes de atividade ...	94
Figura 24 -	Curvas típicas do teste de atividade metanogênica específica	113
Figura 25 -	Curva referente ao 1º exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de de Zeeuw (1984)	116
Figura 26 -	Curva referente ao 2º exemplo ilustrativo de cálculo de atividade metanogênica específica baseada na técnica de de Zeeuw (1984)	118
Figura 27 -	Curva referente ao teste "branco" do exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica baseada na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) ...	122
Figura 28 -	Curva referente ao teste com substrato (ácido acético) de exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica baseada na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) ...	122

Figura 29 -	Curvas da 1ª Calibração dos Ácidos Voláteis ..	142
Figura 30 -	Curvas da 2ª Calibração dos Ácidos Voláteis (1º Trecho)	143
Figura 31 -	Curvas da 2ª Calibração dos Ácidos Voláteis (2º Trecho)	143
Figura 32 -	Curvas da 3ª Calibração dos Ácidos Voláteis ..	144
Figura 33 -	Curva padrão de metano utilizada no cálculo dos volumes de metano medidos pela técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) ...	148
Figuras 34 a 38 -	Curvas dos Testes do 1º Bloco de Ensaios - Lodo de ESGOTO	161
Figuras 39 a 41 -	Resultados das Análises de Degradação dos Ácidos Voláteis do 1º Bloco de Ensaios	164
Figuras 42 a 58 -	Curvas dos testes do 2º Bloco de Ensaios - Lodo de ESGOTO	168
Figuras 45,46,50,54 e 56 -	Resultados das Análises de Degradação dos Ácidos Voláteis do 2º Bloco de Ensaios - Lodo de ESGOTO.....	171 e 172, 177,182 e 183
Figuras 59 a 69 -	Resultado dos Testes do 3º Bloco de Ensaios - Lodo de ESGOTO	189
Figuras 70 a 74 -	Curvas dos Testes do 4º Bloco de Ensaios - Lodo de ESGOTO	197
Figuras 75 a 80 -	Curvas dos Testes do 5º Bloco de Ensaios - Lodo de ESGOTO	203

Figuras 81 a 83 - Resultados das Análises de Degradação dos Ácidos Voláteis do 5º Bloco de Ensaio - Lodo de ESGOTO	211
Figuras 84 a 124 - Curvas dos Testes do 6º Bloco de Ensaio - Lodo de ESGOTO	213
Figuras 125 a 148 - Curvas dos Testes do 7º Bloco de Ensaio - Lodo HERO	262
Figuras 149 a 172 - Curvas dos Testes do 8º Bloco de Ensaio - Lodo ANTARCTICA	291
Figuras 173 a 195 - Curvas dos Testes do 9º Bloco de Ensaio - Lodo COOPERSUCAR	320
Figuras 196 a 220 - Curvas dos Testes do 10º Bloco de Ensaio - Lodo SÃO MARTINHO	348
Figuras 221 a 224 - Curvas dos Testes do 11º Bloco de Ensaio - Lodo HERO	378
Figuras 225 e 226 - Resultados das Análises de Degradação dos Ácidos Voláteis do 11º Bloco de Ensaio - Lodo HERO	382 e 383
Figuras 227 a 230 - Curvas dos Testes do 11º Bloco de Ensaio - Lodo ANTARCTICA	385
Figuras 231 e 232 - Resultados das Análises de Degradação dos Ácidos Voláteis do 11º Bloco de Ensaio - Lodo ANTÁRCTICA	389 e 390
Figuras 233 a 235 - Curvas dos Testes do 11º Bloco de Ensaio - Lodo de ESGOTO	392
Figuras 236 a 239 - Curvas dos Testes do 11º Bloco de Ensaio - Lodo SÃO MARTINHO	396

Figuras 240 a 241 - Resultados das Análises de Degradação dos Ácidos Voláteis do 11º Bloco de Ensaio - Lodo SÃO MARTINHO	400 e 401
Figuras 242 a 245 - Curvas dos Testes do 11º Bloco de Ensaio - Lodo COOPERSUCAR	403
Figuras 246 e 247 - Resultados das Análises de Degradação dos Ácidos Voláteis do 11º Bloco de Ensaio - Lodo COOPERSUCAR	407 e 408
Figuras 248 a 252 - Curvas dos Testes do 12º Bloco de Ensaio - Lodos HERO, ANTÁRTICA, ESGOTO, SÃO MARTINHO, e COOPERSUCAR	410
Figuras 253 a 256 - Curvas dos Testes do 13º Bloco de Ensaio - Lodos HERO, ANTÁRTICA, SÃO MARTINHO e COOPERSUCAR	420
Figuras 257 a 260 - Curvas dos Testes do 14º Bloco de Ensaio - Lodo de ESGOTO	425
Figuras 261 a 268 - Curvas dos Testes do 14º Bloco de Ensaio - Lodo HERO	430
Figuras 269 a 292 - Variação da Atividade Metanogênica Específica com a Relação Substrato/Biomassa em testes com os Lodos de ESGOTO, HERO, ANTÁRTICA, COOPERSUCAR e SÃO MARTINHO ...	442

Lista de cromatogramas

Cromatograma 01 -	Identificação dos ácidos voláteis no cromatograma, através da sequência de eluição	99
Cromatograma 02 -	Sequência de eluição do biogás na coluna Porapak Q	103
Cromatograma 03 -	Análise de biogás utilizada nos cálculos da tabela 20	105
Cromatograma 04 -	Análise de biogás antes da passagem pela solução de hidróxido de sódio	142
Cromatograma 05 -	Análise de biogás após a passagem pela solução de hidróxido de sódio	142

Lista de Abreviaturas

ATP -	Adenosinatritofato
CNTP -	Condições Normais de Temperatura e Pressão
DBO -	Demanda Bioquímica de Oxigênio - ml^{-3}
DCT -	Detector de Condutividade Térmica
DIC -	Detector de Ionização de Chama
DQO -	Demanda Química de Oxigênio - ml^{-3}
g -	Aceleração da gravidade - lt^{-2}
gHA_c/gSSV -	grama de ácido acético por grama de sólidos suspensos voláteis - mm^{-1}
MTP -	Metanopterina
RTR -	Resposta Térmica Relativa
SSV -	Sólidos suspensos voláteis
STP -	Sarcinopterina
y -	Coefficiente de produção celular - mm^{-1}

RESUMO

A atividade metanogênica específica foi estudada neste trabalho a partir do levantamento de diversas metodologias propostas para a realização desse teste. Procurou-se otimizar o teste de atividade metanogênica tomando-se por base a metodologia adotada por Willem de Zeeuw (1984).

No desenvolvimento do trabalho experimentou-se várias condições metodológicas para o teste de atividade, objetivando-se a máxima atividade metanogênica específica do lodo, através de um ensaio que fosse simples e rápido. Para isso, utilizando-se de cinco tipos de lodos anaeróbios, estudou-se a influência das quantidades de biomassa e de substrato, da natureza do substrato, da forma de agitação do meio, das soluções de nutrientes e de metais, da redução do meio com nitrogênio, do volume dos frascos-reatores e do tempo de armazenamento do lodo nos resultados dos testes de atividade.

Observou-se que, em função do tipo de lodo e da sua atividade metanogênica, devem ser pesquisados o substrato mais adequado e a relação ótima entre a quantidade de substrato e biomassa que conduzam à atividade metanogênica específica máxima durante o teste. Observou-se também que o ensaio pode ser mais simples e mais rápido, comparativamente àquele baseado na metodologia de de Zeeuw (1984).

Como conclusão principal são apresentadas novas condições metodológicas para o teste de atividade metanogênica específica para lodos anaeróbios.

ABSTRACT

The specific methanogenic activity test was studied with basis on several methodologies proposed for carrying out the referred test. The methodology used by Willem de Zeeuw (1984) was employed to optimize this test.

Several methodological processes were used for the activity test in an attempt to reach the maximum specific methanogenic activity of the sludge in a simple and quick process. Five types of anaerobic sludges were used and the following parameters were studied: the influence of the amounts of biomass and substrate, the nature of substrate, the liquor mixing, the nutrients and metal solutions, oxygen removal the reactor capacity, and the sludge storage time in the results of the activity tests.

It was observed that the more suitable substrate and the optimum relationship between the quantity of substrate and biomass must be researched, according to the type of sludge, so that the referred relationship leads to a maximum specific methanogenic activity.

It was observed that the test can be quicker and simpler than de Zeeuw's (1984).

The main result reached consists of the presentation of new conditions to carry out the test of specific methanogenic activity for anaerobic sludges.

1 - INTRODUÇÃO

(O conhecimento do processo anaeróbio depende da disponibilidade de parâmetros seguros e eficientes para a sua avaliação. Os parâmetros clássicos utilizados como pH, alcalinidade, DQO, DBO, SSV, ácidos voláteis totais e composição do biogás,) a despeito de serem importantes e úteis, poucas são as informações que eles podem fornecer de relações mais intrínsecas do processo. Face à complexidade das relações entre os diversos grupos de microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia, a sua avaliação mais aprofundada exige análises que são geralmente caras e sofisticadas e/ou consomem tempo de ensaio muito grande. No acompanhamento diário da operação de reatores anaeróbios, estes fatores dificultam uma avaliação mais aprofundada do processo.

(A busca de um parâmetro que pudesse fornecer informações a respeito da biomassa ativa metanogênica do lodo, levou à proposição do teste de atividade metanogênica específica.)

(O teste de atividade metanogênica é um ensaio em escala de bancada de laboratório, que mede a taxa máxima de conversão de substratos específicos a metano por unidade de biomassa presente em um lodo anaeróbio submetido ao teste.)

Revisando-se a literatura a respeito da atividade metanogênica específica observa-se uma diversidade de metodologias para a sua realização. As diferenças ocorrem principalmente na forma de medida do metano, na temperatura do ensaio, na natureza e concentração dos substratos empregados e na quantidade de biomassa.

A importância que o teste de atividade passou a ter no estudo da metanogênese, comprovada pelas inúmeras pesquisas em que ele foi utilizado, e, a falta de uniformização de sua metodologia, justificaram a realização desse trabalho, no sentido de se estudar as diversas metodologias propostas e procurar desenvolver uma metodologia que se aplicasse a lodos anaeróbios, de uma maneira geral.

Tomando-se por base a metodologia utilizada por Willem

de Zeeuw (1984), em função da profundidade com que fora estudada e de sua simplicidade, foram pesquisadas diversas condições metodológicas para o teste de atividade no sentido da sua otimização, qual seja, a busca da máxima atividade metanogênica do lodo, a simplicidade e a rapidez do ensaio.

(A principal importância da determinação da atividade metanogênica específica baseia-se no fato de que este parâmetro pode fornecer informações muito úteis sobre a digestão anaeróbia, através de um ensaio relativamente simples e rápido (de Zeeuw, 1984).)

Como as medidas da atividade metanogênica dão respostas a respeito da potencialidade da biomassa ativa presente nos lodos, esta sua característica tem sido utilizada em diversos estudos. Como por exemplo, no acompanhamento da partida de reatores anaeróbios (de Zeeuw, 1984) e na avaliação de inóculos para a partida desses reatores (Muxi, 1991).

(Valcke & Verstraete (1983) utilizaram-se de medidas da atividade metanogênica específica para estimar a porcentagem de biomassa acetoclástica (aquelas utilizadoras de acetato, como substrato) em lodos anaeróbios.)

Dolfing & Bloemen (1985) estenderam esta proposta para estimar os diferentes grupos fisiológicos presentes nos lodos, através de medidas da atividade metanogênica frente a substratos específicos.

Nos estudos de inibição e toxicidade, as medidas de atividade foram largamente empregadas, como por exemplo, de Zeeuw (1984) estudou a inibição da digestão anaeróbia por substâncias tais como oxigênio e sulfeto. Já Dolfing & Bloemen (1985), estudaram a inibição da atividade por compostos como cloreto de sódio e amônia.

Cohen (1991) estudou o efeito na digestão anaeróbia de produtos químicos industriais como alguns detergentes não iônicos utilizados em sistemas de lavagem de lã de carneiro, através de medidas da atividade metanogênica.

Lema et al (1991) empregaram este parâmetro na avaliação da toxicidade por cloreto de sódio à digestão anaeróbia.

Colleran et al (1991) estudaram o efeito inibitório de hidrocarbonetos halogenados de baixo peso molecular, tais

como cloretos de etileno e metileno e tetracloreto de carbono, sobre espécies acetoclásticas e hidrogenotróficas. Neste trabalho, o efeito inibitório de 6 (seis) concentrações diferentes de cada um destes compostos, foi investigado com base em medidas da atividade metanogênica específica.

Outros pesquisadores têm-se utilizado desse parâmetro para investigar a distribuição da atividade bacteriológica em reatores anaeróbios, como por exemplo, Bull et al (1984) que estudaram a distribuição da atividade em reatores de leito fluidificado, e concluíram que as atividades foram relativamente maiores nas partes intermediárias e superiores do reator. Verificaram também, que a biomassa agregada ao meio suporte (areia) apresentou atividades maiores do que a biomassa dispersa no leito do reator.

Soto et al (1991) estudaram a distribuição da biomassa ativa em filtros anaeróbios mesofílicos e termofílicos, ambos em escala de laboratório. Através de determinações da atividade metanogênica, eles mostraram que a biomassa no filtro anaeróbio mesofílico se distribuía uniformemente, tanto agregado ao suporte quanto dispersa nos interstícios do leito de pedras. Já no filtro termofílico, a maioria da biomassa ativa encontrava-se presa ao suporte na forma de biofilmes.

Zábranská et al (1991) estudou a distribuição da atividade bacteriológica em reatores anaeróbios híbridos, com o auxílio das medidas de atividade metanogênica correlacionadas à quantidade de coenzima F₄₂₀ e à atividade de desidrogenases.

De Zeeuw (1984) estudou o efeito do tempo de armazenamento do lodo à 4°C sobre a atividade metanogênica. }

Colleran et al (1991) investigaram os efeitos sobre a atividade do lodo, quando armazenado seco à 4°C e misturados a crioprotetores. Estudos dessa natureza são importantes quando se pretende estocar lodos de boa qualidade para futuras inoculações, ou armazenar lodos padrões que sirvam de referência para testes de biodegradabilidade anaeróbia (Colleran et al, 1991).

Valcke & Verstraete (1983) também observaram variações na atividade dos lodos, quando armazenados de 10°C a 15°C

durante poucas semanas.

Outra aplicação das medidas de atividade metanogênica específica, está na sua utilização como parâmetro auxiliar de pesquisas mais básicas da digestão anaeróbia. Como exemplo, citam-se as pesquisas relacionadas com o fenômeno de granulação do lodo (Dolfing, 1986; Guiot et al, 1991) e aquelas envolvidas com estudos de correlações entre a atividade metanogênica e as quantidades da coenzima F_{420} (de Zeeuw, 1984; Pause & Switzenbaum, 1984; Zábranská et al, 1985; Dolfing & Mulder, 1985; Dobbernack et al, 1987; Gorris et al, 1987 e Peck, 1989).

Visser et al (1991) avaliaram o efeito da temperatura e do pH no tratamento de resíduos contendo sulfato em condições termofílicas, através de medidas da atividade metanogênica.

Todos os trabalhos relatados são apenas alguns exemplos que confirmam a importância desse parâmetro.

Na sua grande maioria, são trabalhos desenvolvidos a partir de 1983. Após essa data, a literatura tem mostrado um aumento progressivo da utilização de medidas da atividade metanogênica específica em pesquisas da digestão anaeróbia.

Esta constatação permite supor que a determinação deste parâmetro pode fazer parte das análises rotineiras de avaliação desse processo de tratamento.

2 - OBJETIVOS

- Avaliar experimentalmente alguns testes empregados para a medida de atividade metanogênica específica;
- desenvolver e propor uma simplificação nas metodologias mais comumente empregadas para o teste de atividade metanogênica;
- adequar os métodos analíticos para medidas de ácidos orgânicos voláteis e de composição de biogás por cromatografia gasosa à metodologia desenvolvida;

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - A Atividade Metanogênica Específica

3.1.1 - Considerações Preliminares

(Em todos os sistemas de tratamento de resíduos envolvendo processos biológicos, a avaliação qualitativa e quantitativa da biomassa presente é de fundamental importância)

A despeito da concordância unânime dessa afirmativa, o conhecimento mais aprofundado dessa biomassa constitui-se ainda um problema para os pesquisadores.

Em se tratando de sistemas de tratamento por processo de digestão anaeróbia, a complexidade do problema é ainda maior, em virtude da presença de grupos bacterianos de diferentes espécies, muitos deles exibindo baixas taxas de crescimento e condições estritamente anaeróbias para cultivo (Colleran et al, 1991).

A dificuldade também aumenta, pelo fato de que em modernos reatores anaeróbios, a biomassa desenvolve-se tanto em biofilmes aderidos a suportes inertes, como em grânulos ou flocos dentro do reator (Colleran et al, 1991).

(Pelo menos três diferentes grupos metabólicos de microrganismos estão envolvidos na digestão anaeróbica de matéria orgânica a metano e dióxido de carbono: o das bactérias fermentativas, o das acetogênicas e o das metanogênicas (Bryant apud Dobbernack et al, 1988). A estabilidade do processo depende muitas vezes do grupo metanogênico, considerado geralmente o mais sensível das populações bacterianas atuantes (Wolf & Higgins, 1979 apud Dobbernack et al, 1988). Consequentemente, o monitoramento

da digestão anaeróbia demanda uma quantificação seletiva da biomassa ou uma avaliação da atividade metabólica das bactérias metanogênicas (Dobbernack et al, 1988).

(Os métodos normalmente utilizados para quantificação de biomassa em processos anaeróbios são, a determinação da quantidade de sólidos suspensos voláteis (SSV), a contagem de colônias viáveis ou a estimativa numérica de bactérias metanogênicas e não-metanogênicas (técnicas do "roll-tube" ou do número mais provável, respectivamente) e a medida da quantidade de coenzima F₄₂₀.)

O primeiro, embora de fácil execução, fornece apenas uma indicação da quantidade de biomassa dentro do reator, pois o método não permite distinção entre a biomassa microbiológica e qualquer outro material orgânico particulado da amostra ensaiada, nem tampouco fornece indicação sobre a atividade das bactérias presentes (Colleran et al, 1991). Apesar de representar uma avaliação grosseira da biomassa, a simplicidade dessa forma de medida tem justificado o seu uso. Além disso, [as medidas da quantidade de SSV têm também mostrado boas correlações com as medidas de atividade, tais como taxa de produção de gás (Valcke & Verstraete, 1983; de Zeeuw, 1984; Dolfig & Bloemen, 1985). A técnica de contagem de bactérias é um método pouco prático devido aos longos períodos de incubação e condições de anaerobiose estrita requeridos (Colleran et al, 1991).)

Algumas tentativas de redução do tempo de incubação foram feitas na avaliação quantitativa de bactérias não-metanogênicas pelo método do "roll-tube". Procurou-se obter o número de bactérias esperado no tempo de incubação padronizado (10 dias), a partir dos valores de contagens encontrados na metade do período de incubação (5 dias), associados a um fator calculado estatisticamente com base em dados do próprio experimento (Giaj-Levra et al, 1990 apud Vazoller, 1990). Esta proposição necessita ainda ser mais investigada para a otimização do método bem como sua possível aplicação a outros grupos de bactérias, como as metanogênicas.

Outro problema da avaliação quantitativa de lodos anaeróbios diz respeito à preparação da amostra a ser submetida à contagem (Vazoller, 1990). É necessário que ela seja coletada e homogeneizada adequadamente, afim de possibilitar valores confiáveis (Vazoller, 1990).

O cofator F₄₂₀, uma coenzima encontrada unicamente em bactérias metanogênicas, e em ambientes anaeróbios, tem sido sugerido como forma de identificação e quantificação desse grupo de bactérias (Delafontaine et al, 1979; Eirich et al, 1979 apud de Zeeuw, 1984; Van Beelen, 1979 apud Gorris et al, 1988; Gorris & Van der Driff, 1987). Ensaios quantitativos da coenzima F₄₂₀, baseados nas suas propriedades de fluorescências, têm sido desenvolvidos para mensurar o número de metanogênicas (Van Beelen et al, 1979 apud Gorris et al, 1987) ou para avaliar a atividade metanogênica em habitats anaeróbios (Biot et al, 1981; de Zeeuw, 1984; Whitmore et al, 1986 apud Vazoller, 1990).

A coenzima F₄₂₀ é o aceptor inicial de elétrons do hidrogênio, e serve também como transportador de elétrons para uma variedade de enzimas desidrogenases e NADP oxiredutase (Vogels et al, 1988 apud Vazoller, 1990). É um composto de baixo peso molecular que na sua forma oxidada fluoresce com um forte pico de absorção a 420nm (Eirich et al, 1979 apud de Zeeuw, 1984). Quando reduzida, tanto a sua absorção a 420 nm quanto a sua fluorescência são perdidas (Zeikus, 1977 apud Vazoller, 1990).

A determinação quantitativa da coenzima F₄₂₀ em lodos anaeróbios por técnicas de extração e fluorimetria foi feita pela primeira vez por Delafontaine et al (1979).

Apesar do desenvolvimento das técnicas de quantificação dessa coenzima, os resultados obtidos têm apresentado certas discrepâncias. De Zeeuw (1984), afirmou que o conteúdo de F₄₂₀ varia entre as diversas espécies metanogênicas, como pode ser constatado pelos valores apresentados na Tabela 01. Mesmo entre espécies idênticas e convertendo o mesmo substrato, os dados mostram que foram encontradas diferenças apreciáveis de F₄₂₀ em *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Tabela 01 - Conteúdo de F₄₂₀ em culturas metanogênicas puras

ESPÉCIES	Conteúdo de F ₄₂₀ (*) (mmol/kg de peso seco)
HIDROGÊNIO	
<i>Methanobacterium bryantii</i>	2,35
<i>Methanobacterium bryantii</i>	1,35
<i>Methanobacterium</i> <i>thermoautotrophicum</i>	1,9
<i>Methanobacterium</i> <i>thermoautotrophicum</i>	1,5
<i>Methanobacterium</i> <i>thermoautotrophicum</i>	0,45-0,6
<i>Methanobrevibacter</i> <i>arboriphilus</i>	1,8
<i>Methanobrevibacter</i> <i>ruminantium</i>	0,04
FORMIATO	
<i>Methanococcus vanielii</i>	2,4
ACETATO	
<i>Methanosarcina barkeri</i>	0,09
<i>Methanotherix sohngeni</i>	0,32
(*) Os dados foram convertidos para uniformizar as dimensões, usando o valor de 840 para o peso molecular do F ₄₂₀ , um conteúdo de proteína igual a 0,5g/g de peso seco e uma relação peso seco: peso líquido igual a 0,2	

Fonte: de ZEEUW (1984)

Observa-se que o conteúdo de F₄₂₀ nas metanogênicas hidrogenotróficas é significativamente maior do que nas acetotróficas.

Pause & Switzenbaum (1984) notaram que as concentrações de F₄₂₀ em reatores anaeróbios foram dependentes das condições fisiológicas do crescimento

bacteriano. Estas concentrações aumentaram com o tempo de retenção celular e variaram com o tipo de substrato utilizado. Zábranská et al (1985) também observaram que o conteúdo de F_{420} em reatores anaeróbios era dependente do substrato e das condições de cultivo celular, e que as hidrogenotróficas contêm uma quantidade muito maior de F_{420} do que as acetotróficas.

Recentemente, este cofator foi analisado por técnicas de cromatografia líquida de alta pressão (Gorris et al, 1988; Van Beelen et al, 1979 apud Gorris, 1988) revelando que na verdade, os dois níveis tróficos metanogênicos contêm tipos estruturalmente distintos de F_{420} . Geralmente, as espécies hidrogenotróficas contêm metanoptertina (MTP) e coenzima F_{420}^{-2} , enquanto as espécies acetotróficas contêm sarcinoptertina (STP) e coenzimas F_{420}^{-4} e F_{420}^{-5} (Gorris et al, 1988). Esta descoberta tem possibilitado a quantificação de ambos os tipos tróficos de metanogênicas, separadamente, em lodos anaeróbios, com base nos diferentes cofatores presentes (Gorris & Vander Drift, 1987 apud Gorris et al, 1988). Com os métodos de fluorimetria, esta distinção não era possível, e assim, todos os tipos de coenzima F_{420} eram quantificados em conjunto.

Trabalhos experimentais como os mencionados, em que estruturas moleculares específicas à bioquímica da metanogênese são elucidadas, poderão levar a respostas mais efetivas na quantificação de espécies bacterianas metanogênicas em lodos anaeróbios (Gorris et al, 1988).

Outros parâmetros têm sido propostos para a quantificação da biomassa em lodos anaeróbios e a correlação com medidas da atividade metabólica de organismos desses lodos.

Chung & Neething (1988), propuseram a utilização de medidas de adenosina trifosfato (ATP) para avaliar a biomassa de lodos anaeróbios. Segundo estes autores, as medidas de ATP podem refletir bem a quantidade de biomassa ativa dos lodos porque ela desaparece rapidamente após a morte da célula. Suas pesquisas mostraram também, que o conteúdo de ATP de um lodo anaeróbio produziu boa

correlação com medidas de atividade do lodo, tais como a taxa de produção de gás. Entretanto, este método tem sua utilização limitada já que ele reflete apenas a atividade total do lodo, pois as medidas não fazem distinção entre os vários processos bioquímicos envolvidos e conseqüentemente não pode ser referido a grupos específicos de bactérias do lodo (Chung & Neething, 1988).

Em outro trabalho, Chung & Neething (1989) sugeriram a utilização das medidas de atividade de enzimas desidrogenases (DHA) para determinar a atividade de um grupo distinto de bactérias da digestão anaeróbia. Por exemplo, atividade de bactérias acetotróficas poderia ser medida pela adição de acetato como substrato durante as medidas de DHA.

Outros pesquisadores que realizaram medidas de atividade das desidrogenases, foram Zábranská et al (1991) que utilizaram este parâmetro na análise de vários substratos como lactose e os ácidos acético, propiônico e fórmico.

Na digestão anaeróbia de resíduos líquidos, a etapa limitante é geralmente a metanogênese, por isso, tem havido um grande interesse por parte dos pesquisadores no estudo dessa fase. Estes estudos têm se concentrado principalmente em pesquisas relacionadas com a microbiologia do processo, notadamente das espécies metanogênicas.

O aprofundamento desse conhecimento, passa, dentre outros aspectos, pela identificação, quantificação, estudo das relações metabólicas e dos substratos específicos e dos tipos bacterianos presentes nas amostras de lodo.

Tendo em vista a complexidade de se quantificar cada uma destas espécies bacterianas tem-se, como já abordado, lançado mão de parâmetros indiretos de medida através da avaliação da taxa de produção de gás metano (atividade metanogênica), frente aos substratos destas bactérias.

Este parâmetro tem se tornado atraente na avaliação dos processos de digestão anaeróbia, pois fornece informações a respeito dos grupos de bactérias metanogênicas e/ou de algumas espécies isoladamente, e sobretudo fornece

informações em relação à velocidade da metanogênese como um todo (Valcke & Verstraete, 1983; Dolfig & Bloemen, 1985).

3.1.2 - Conceito e formas de expressão de medida da atividade metanogênica

A atividade metanogênica pode então ser definida, como um parâmetro que mede a taxa de conversão de substratos a metano, por microrganismos metanogênicos presentes em lodos anaeróbios. Quando esta taxa se referir à quantidade de biomassa desses lodos, o parâmetro denominar-se-á atividade metanogênica específica. A quantidade de biomassa é normalmente medida pelos sólidos voláteis em suspensão da amostra (Valcke & Verstraete, 1983; de Zeeuw, 1984; Dolfig & Bloemen, 1985; Dubourguier apud Vazoller, 1989; James et al, 1990; Colleran, 1991).

Alguns estudos têm sido realizados no sentido de correlacionar a atividade metanogênica a outros parâmetros, tais como as quantidades de F_{420} (de Zeeuw, 1984; Pause & Switzenbaum, 1984; Záborská et al, 1985; Dolfig & Mulder, 1985; Dobbernack et al, 1987; Gorris et al, 1988, etc), ATP e DHA (Chung & Neething, 1988 e 1989 e Záborská et al, 1991).

A atividade metanogênica específica pode ser obtida diretamente através de medidas das taxas de conversão de substratos, ou, indiretamente através das taxas de produção de metano (de Zeeuw, 1984; Colleran et al, 1991).

A maioria dos testes desenvolvidos baseou-se em medidas de metano ao invés da depleção do substrato (Van der Berg, 1974; Valcke & Verstraete, 1983; de Zeeuw, 1984; Dolfig & Bloemen, 1985; James et al, 1990; Colleran et al, 1991; Soto et al, 1991). Segundo Dolfig & Bloemen (1985), a determinação da atividade metanogênica é mais fácil e acurada quando são utilizadas as medidas de produção de

metano, ao invés das medidas de decréscimo das concentrações de substrato.

A atividade metanogênica específica do lodo é calculada através da inclinação máxima da curva de produção cumulativa de metano por unidade de biomassa desse lodo (de Zeeuw, 1984).

As curvas da Figura 1, obtidas por de Zeeuw (1984) mostram que o valor da tangente no trecho de inclinação máxima de cada uma das curvas, fornece a medida da atividade metanogênica específica de cada um dos lodos estudados.

**Produção de Metano Específica
Acumulada ($\text{g CH}_4 - \text{DQO} . \text{g SSV}^{-1}$)**

Figura 1 - Produção acumulada de metano por unidade de biomassa obtida em testes de atividade com três diferentes amostras de lodo digestor de esgoto doméstico (de Zeeuw, 1984).

A atividade metanogênica quando calculada, dessa forma, será expressa por $\text{g}(\text{CH}_4 - \text{DQO}) . \text{gSSV}^{-1} . \text{dia}^{-1}$ ou $\text{kg}(\text{CH}_4 - \text{DQO}) . \text{kSSV}^{-1} . \text{dia}^{-1}$.

Nesta expressão, as medidas de produção de metano são correlacionadas às quantidades de DQO consumidas, através de cálculos estequiométricos.

Dentre os autores que estudaram e desenvolveram metodologias de medida de atividade metanogênica específica, observa-se uma grande diversidade de formas de expressar este parâmetro. De Zeeuw (1984) e Soto et al (1991) adotaram a expressão $\text{g}(\text{CH}_4\text{-DQO}).\text{gSSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Dolfing & Bloemen (1985) e Colleran et al (1991) adotaram $\mu\text{molCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Já, Dubourguier (1989) apud Vazoller, (1989) utilizou $\mu\text{molCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Valcke & Verstraete (1983) e James et al (1990) empregaram $\text{mlCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Quando a atividade metanogênica é medida em relação à quantidade de coenzima F_{420} , as unidades têm sido: $\text{lCH}_4.\mu\text{molF}_{420}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Zábranská et al, 1984; Pause & Switzenbaum, 1984; Gorris et al, 1988); $\mu\text{molF}_{420}^{-1}.\text{min}^{-1}$. (Dolfing & Mulder, 1985); $\mu\text{molCH}_4.\mu\text{molF}_{420}^{-1}.\text{hora}^{-1}$ (Dobbernack et al, 1987); $\text{mg}(\text{CH}_4\text{-DQO}).\text{nmolF}_{420}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (de Zeeuw, 1984).

Observa-se, entretanto, que as unidades utilizadas pelos diversos autores mencionados, divergem basicamente quanto à medida de produção de metano. Dessa forma, é possível uniformizar estas unidades, através de relações estequiométricas, desde que os volumes de metano medidos sejam referidos às condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Com isto, é possível fazer uma comparação dos valores de atividade metanogênica específica, expressos nas diferentes unidades mencionadas.

Deve-se ressaltar porém, que comparações dessa natureza necessitam não apenas que os valores numéricos sejam convertidos à uma unidade comum. É necessário também, que as atividades metanogênicas medidas, sejam as taxas específicas máximas de conversão de substratos das bactérias presentes, isto é, representem a atividade potencial das bactérias metanogênicas. Para isso, as condições do ensaio devem ser as melhores possíveis para que as taxas de produção de metano atinjam valores máximos durante os testes, sejam elas relativas ao grupo

metanogênico como um todo ou, às espécies distintas dessas bactérias.

Estas condições serão discutidas adiante, quando da apresentação dos estudos relacionados com a metodologia do teste de atividade metanogênica específica.

3.2 - Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica

3.2.1 - Considerações Gerais

De uma maneira geral, a metodologia para determinação da atividade metanogênica específica, "o teste de atividade", consiste de um ensaio em batelada, em que uma quantidade fixa de substrato é adicionada a uma pré-determinada quantidade de lodo anaeróbio. A atividade específica do lodo é calculada através da taxa de produção de metano, ou de decaimento de substrato, em relação à quantidade de lodo presente (de Zeeuw, 1984). Como a quantidade de biomassa viável deve ser mantida constante durante a realização do teste, devem ser tomados cuidados para que o inevitável crescimento durante o experimento, seja desprezível (de Zeeuw, 1984).

Outro cuidado da metodologia é prover condições ótimas para que, durante o teste, as bactérias metanogênicas convertam os substratos a metano, nas suas taxas máximas.

A definição destas condições é que tem levado a diferenças nas metodologias propostas para o teste de atividade. Por exemplo, alguns autores (Valcke & Verstraete, 1983; de Zeeuw, 1984; James et al, 1990; Visser et al, 1991) utilizaram soluções de nutrientes nos testes, enquanto outros (Dolfing & Bloemen, 1985; Coates, 1991 apud Colleran, 1991; Soto et al, 1991) dispensaram estes nutrientes.

Quanto aos valores da temperatura do teste para lodos mesofílicos e do pH inicial, notam-se algumas diferenças. Valcke & Verstraete (1983), de Zeeuw (1984), Dolfing & Bloemen (1985), adotaram a temperatura de 30°C. Quanto ao pH de início dos testes, o primeiro autor fixou-o em 6,7 e os outros dois trabalharam com pH igual a 7,0. Autores como

Bull et al (1983) e Dubourguier (1989) apud Vazoller (1989) adotaram a temperatura de 37°C. Já James et al (1990) e Cohen (1991) realizaram os testes na temperatura de 35°C. Em relação ao pH, Bull et al (1983) adotaram o valor igual a 7,4, James et al (1990) igual a 6,8, Soto et al (1991) igual a 7,0. Já Dubourguier (1989) apud Vazoller (1989) e Cohen (1991) não ajustaram o pH para início do teste.

Outras condições propostas para a realização do teste de atividade metanogênica, apresentam algumas diferenças. Dentre elas citam-se, as formas de agitação e de medida da produção de metano. Entretanto, observa-se como uma das condições mais conflitantes, a definição das quantidades de biomassa e de substrato bem como a definição da natureza desse substrato.

As questões relativas à biomassa (quantidade e crescimento durante o teste) e ao substrato (natureza e quantidade), serão discutidas a seguir. Antes porém, acrescenta-se que, sob condições bem definidas, a atividade do lodo pode ser deduzida através de medidas "in situ" da atuação do reator (de Zeeuw, 1984). Para isso, é necessário que sejam determinadas as taxas de produção de metano e a quantidade de biomassa ativamente participante do processo. A taxa de carga orgânica aplicada ao reator, determina o quanto a atividade global do lodo aproxima-se da sua atividade máxima (de Zeeuw, 1984).

Os testes de atividade metanogênica específica devem, na medida do possível, serem acompanhados por análises que monitorem a degradação do substrato e a composição do biogás. Estas análises, aliadas a ensaios microbiológicos e bioquímicos, como identificação e contagem do NMP de bactérias, quantidade de coenzima F₄₂₀, etc, aumentam em muito a potencialidade de resposta desse parâmetro (de Zeeuw, 1984).

3.2.2 - A biomassa para os testes

Para medidas da atividade metanogênica, a quantidade de biomassa é determinada pelo peso de sólidos suspensos voláteis da amostra de lodo ensaiada.

Para essa determinação, quase todos os trabalhos consultados sobre metodologias para o teste de atividade, utilizaram-se da metodologia definida pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1975). Uma das exceções foi o trabalho de Pereira et al (1986), onde foi desenvolvido um método modificado do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1975) para as determinações de SSV do lodo.

Essa modificação consistiu basicamente da substituição da filtração das amostras em filtros de membrana, pela centrifugação. Dolfing & Bloemen (1985) também utilizaram-se dessa técnica. A quantidade de biomassa utilizada nas medidas de atividade era determinada pelo volume do lodo empregado multiplicado pela concentração de SSV do lodo definida para o teste.

Valcke & Verstraete (1983) adotaram concentrações em torno de 5,0 g/l e volume útil de 1,0 ℓ para o frasco-reator. De Zeeuw (1984), após várias investigações, sugeriu a concentração de 2,5 g/l de SSV para o teste. Segundo este pesquisador, esta concentração conduziu a valores mais constantes das medidas de atividade em testes idênticos. Os volumes úteis dos frascos-reatores foram iguais a 2,5 ℓ ou 5,0 ℓ . Ocasionalmente, de Zeeuw utilizou-se de frascos de soro de 0,1 ℓ . Concentrações de 2,5 g/l foram também usadas por James et al (1990), em frascos com volume útil igual a 35 ml.

Dolfing & Bloemen (1985) utilizaram porções de 100 a 1000 mg de lodo, distribuídas em frascos de 130 ml, com 40 ml de solução tampão. Já, Dubourguier (1989) apud Vazoller (1989) utilizou 100 g de lodo em frascos de 250 ml, sem qualquer solução de nutrientes.

Concentrações de SSV do lodo variando de 1,42 g/l a 6,62 g/l foram usadas por Soto et al (1991), em 12 (doze) diferentes testes de atividade metanogênica, com frascos-reatores de 100 ml.

Visser et al (1991) realizaram os testes em frascos de 100 ml, com concentrações de SSV do lodo em torno de 3 g/l.

Do que foi relatado, pode-se observar que não existe uniformização dos testes quanto à quantidade de biomassa empregada. Concentrações em torno de 2,5 a 3,0 g/l de SSV, foram as mais utilizadas (de Zeeuw, 1984; James et al, 1990 e Visser et al, 1991).

Em relação ao crescimento da biomassa durante a realização dos testes, foi recomendado por Valcke & Verstraete (1983) e Dolfig & Bloemen (1985) que eles fossem realizados no menor tempo possível, para evitar um crescimento significativo. Estes autores, justificaram a ausência de adição de elementos traços e vitaminas com esta finalidade. Os outros dois autores mencionados, observaram que durante um período de 24 horas de incubação o crescimento da biomassa foi mínimo em testes com acetato.

James et al (1990) fizeram medidas da quantidade de SSV no início e no final dos testes. Eles notaram que à excessão de um único teste, estes resultados não acusaram qualquer aumento significativo de biomassa. Ao contrário, um pequeno decréscimo de SSV foi medido ao final de vários testes.

Coates (1991) apud Colleran et al (1991) observou que em lodos com atividades baixas em hidrogênio e dióxido de carbono, o crescimento de bactérias metanogênicas utilizadoras de hidrogênio foi significativo, em virtude do maior tempo consumido no ensaio e das taxas de crescimento mais elevadas destas espécies. Este pesquisador notou que, mesmo sem qualquer adição de nutrientes ao meio durante o ensaio, ocorria um crescimento dessa biomassa. Ele presumiu que estes nutrientes foram fornecidos pela própria amostra de lodo utilizada como inóculo no teste.

Dos trabalhos abordados nesta revisão, de Zeeuw (1984) foi quem apresentou um estudo mais aprofundado sobre a questão do crescimento da biomassa durante os testes de atividade metanogênica.

Segundo cálculos teóricos, ele chegou à conclusão de que o crescimento máximo esperado durante a realização do ensaio seria de 7% para lodos com atividade específica igual a $1,0 \text{ g (CH}_4\text{-DQO).gSSV}^{-1}\text{.dia}^{-1}$. Esses cálculos foram assim obtidos.

Adotando-se como $0,6 \text{ g/l}$ a concentração individual dos ácidos acético, propiônico e butírico (DQO teórica total de $2,64 \text{ g/l}$) e como $2,5 \text{ g/l}$, a concentração de SSV do lodo no teste; o coeficiente de produção celular $y=0,024 \text{ gSSV/gDQO}$ (obtido em ensaio) e a atividade específica máxima do lodo igual a $2,85 \text{ g(CH}_4\text{-DQO).gSSV}^{-1}\text{.dia}^{-1}$ (Tab.5 do Cap.6 de de Zeeuw), mostram que a conversão de $2,64 \text{ g/l}$ de DQO produz $2,64 \times 0,024 = 0,063 \text{ g}$ de SSV/l de meio.

A quantidade de biomassa metanogênica viável do lodo pode ser estimada através da relação entre a atividade específica máxima da biomassa cultivada com os substratos do teste e a atividade metanogênica medida da amostra de lodo. Por exemplo, para uma atividade específica medida do lodo igual a $1,0 \text{ g(CH}_4\text{-DQO).gSSV}^{-1}\text{.dia}^{-1}$ e uma concentração de $2,5 \text{ g/l}$ de SSV, a quantidade de biomassa viável será:

$$(1,0/2,85) \times 2,5 = 0,88 \text{ g/l}$$

Assim, o aumento máximo durante o teste de atividade seria:

$$0,063/0,88 \times 100 = 7\%$$

Segundo o mesmo autor, essa porcentagem de crescimento pode ser ainda menor, pois a atividade máxima é atingida quando apenas parte do substrato foi consumido.

De Zeeuw (1984) afirmou que este crescimento pode ser desprezado para lodos granulares (de reatores de manta de lodo). Esta afirmativa foi comprovada por resultados de ensaios com lodos dessa natureza, onde a atividade após uma segunda alimentação, não foi maior do que a verificada na primeira adição de substratos. Nestes testes, a duração dos ensaios variou de 12h a 48h.

Porém, em se tratando de lodos de digestor de esgotos domésticos, de Zeeuw (1984) observou que em todos os ensaios realizados, uma segunda alimentação sempre conduziu a um valor maior de atividade. Isso poderia, então, ser atribuído, em parte, ao crescimento da biomassa.

Adotando-se o mesmo desenvolvimento de cálculo anterior, para lodos de digestor de esgoto com valores típicos de atividade específica entre 0,1 e 0,2 g(CH₄-DQO)/g.SSV⁻¹.dia⁻¹, de Zeeuw (1984) esperaria um crescimento entre 36% e 72%. Dessa forma, seriam introduzidos erros grosseiros nas medidas da atividade metanogênica.

Os cálculos mostram que um aumento na concentração de SSV do lodo no teste poderia reduzir este erro. Porém, de Zeeuw (1984) constatou que testes com concentrações maiores de lodo (acima de 3 g/l de SSV), conduziram a valores mais baixos e também menos constantes da atividade.

3.2.3 - Os substratos para os testes

A atividade metanogênica de um sistema anaeróbio depende da presença de bactérias metanogênicas e de substratos que são convertidos por estas bactérias a metano. Tais substratos podem estar disponíveis em quantidades adequadas ou podem ser derivados de outros compostos por bactérias não-metanogênicas que estão na maioria das vezes vivendo numa relação sintrófica com as metanogênicas (Mah, 1982 apud Dolfig & Bloemen, 1985).

Para se obter a atividade metanogênica específica máxima nos ensaios, é necessário então, que haja substratos próprios de todas as espécies metanogênicas presentes e em quantidades tais que não afetem as taxas de conversão, isto é, não sejam fatores limitantes do processo (Valcke & Vesrtraete, 1983; Dolfig & Bloemen, 1985).

A conversão completa de matéria orgânica complexa solúvel em ambientes anaeróbios envolve diversas etapas.

Durante a conversão são formados compostos como hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, acetato e outros ácidos voláteis, principalmente o propionato e o butirato (Westermann et al, 1989). Propionato e butirato podem ser convertidos a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono por bactérias acetogênicas sintróficas, as acetogênicas produtoras de hidrogênio, como mostram as reações (1) e (2) (Hanaki et al, 1981; Thiele et al, 1987).

Propionato:

$$\Delta G'_0 = +76 \text{ kJ/mol}$$

n-Butirato:

$$\Delta G'_0 = +48,1 \text{ kJ/mol}$$

O acetato e o hidrogênio molecular produzidos nestas reações podem ser convertidos a metano pelas bactérias metanogênicas, segundo as equações (3) e (4) (Hanaki et al, 1981).

$$\Delta G'_0 = -31 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G'_0 = -135,6 \text{ kJ/mol}$$

As reações (1) e (2) são termodinamicamente desfavoráveis ($\Delta G'_0$ positivo), a menos que a pressão parcial de hidrogênio seja mantida extremamente baixa, da ordem de

10^{-4} a 10^{-6} atm (Harper & Pohland, 1986 apud Fukuzaki et al, 1989).

A bactéria metanogênica utiliza hidrogênio molecular tão rapidamente que a pressão parcial de hidrogênio pode manter-se baixa o bastante para assegurar a efetiva atuação da bactéria acetogênica produtora de hidrogênio. Isto mostra que a degradação de ácidos voláteis como propionato e butirato via oxidação anaeróbia, depende em muito da atividade das bactérias metanogênicas (Hanaki et al, 1981).

Destas considerações, pode-se afirmar que os principais substratos precursores de metano são, diretamente acetato e hidrogênio e o dióxido de carbono, e, indiretamente, o propionato e o butirato.

Acetato é o principal substrato para produção de metano, já que aproximadamente 70% desse gás são oriundos daquele composto, de acordo com a reação (3) (Gujer & Zehnder, 1983). Os outros 30% seriam provenientes do hidrogênio e o dióxido de carbono, conforme a reação (4),

Consequentemente, na determinação da atividade metanogênica de lodos anaeróbios, estes substratos são os que devem estar disponíveis no meio como fonte para a produção de metano.

Eles podem ser fornecidos diretamente ao meio como empregado por Dolfing & Bloemen (1985), que utilizaram o acetato e hidrogênio e dióxido de carbono, ou, indiretamente, através de alguns de seus principais precursores, como estudado por de Zeeuw (1984), James et al (1990), Visser et al (1991) e Soto et al (1991), os quais utilizaram além do acetato, o propionato e o butirato.

Alguns autores têm medido a atividade metanogênica frente a substratos adicionados em separado como acetato, propionato e butirato (Dubourguier, 1989 apud Vazoller, 1989); acetato, propionato, butirato, etanol e metanol (Colleran et al, 1991) e acetato e formiato (Dolfing & Bloemen, 1985).

Soto et al (1991) utilizaram também o próprio resíduo que alimentava o reator, como substrato para alguns testes de atividade.

O conhecimento da degradação individual dos ácidos voláteis utilizados como substrato no teste é também muito útil. Através dele, é possível estimar-se as taxas máximas de conversão de cada substrato e com isso obter informações sobre inibição ou limitação do processo por concentrações muito elevadas ou insuficientes de algum tipo de ácido. Pode ainda ser útil na avaliação das espécies presentes (Dolfing & Bloemen, 1985).

As Figuras 2 e 3 mostram a degradação dos ácidos acético, propiônico e butírico, utilizados como substrato por de Zeeuw (1984) em sua forma ionizada (acetato, propionato e butirato). Os testes de atividade foram feitos com lodo de digestor de esgoto doméstico, submetidos a duas alimentações.

O experimento da Figura 2 mostra um grande retardo (fase "lag", ou de adaptação), na degradação do butirato.

Em ambos os experimentos, a atividade foi sempre maior na 2ª alimentação, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo crescimento de nova biomassa, como exposto anteriormente.

Figura 2: Degradação de acetato, propionato e butirato em testes de atividade metanogênica com lodo de digestor de esgoto do tipo F5, descrito na Tab.1, Cap.4 (de Zeeuw, 1984)

Figura 3: Degradação de acetato, propionato e butirato em testes de atividade metanogênica com lodo de digestor de esgoto do tipo E5, descrito na Tab.1, Cap.4 (de Zeeuw, 1984).

3.2.4 - As medidas de metano durante os testes

As medidas de atividade metanogênica específica são experimentos em escala de laboratório, portanto, os volumes de metano produzidos durante os testes são geralmente muito pequenos.

Sabe-se que quanto menores os valores das grandezas medidas, mais acurados devem ser os equipamentos e maiores os cuidados com a medição.

Em se tratando de medidas de volume de gás, os cuidados devem ser ainda maiores, pois sendo fluidos compressíveis, sofrem consequentemente variações de volume com a pressão e a temperatura.

Para as medidas em questão, acresce-se outra dificuldade, pois o biogás produzido no processo contém outros gases além do metano. Dentre estes, o de maior quantidade relativa é o dióxido de carbono, e dessa forma, deve ser separado, ou, quantificado, para se obter os volumes de metano.

Outro problema relacionado com esta medida refere-se à solubilidade dos diferentes gases do processo no meio líquido. Para isso chama atenção o trabalho de Paus et al (1990), com respeito às limitações de transferência de massa dos gases metano e hidrogênio.

Na metodologia desenvolvida por James et al (1990), as solubilidades de metano e dióxido de carbono são levadas em conta nas medidas de metano utilizadas no cálculo da atividade.

Como a determinação da atividade metanogênica específica se baseia nas taxas de metano produzido por unidade de biomassa ativa presente, é de fundamental importância que estas taxas sejam medidas com a melhor precisão possível (James et al, 1990).

Nas metodologias revisadas neste trabalho, destacam-se quatro tipos distintos de sistemas de medida dos volumes de metano, a saber:

- a - Sistemas de medida por deslocamento de líquido (Valcke & Verstraete, 1983), do tipo frasco de Mariotte (de Zeeuw, 1984; Soto et al, 1991).
- b - Sistemas de deslocamento de líquido, tipo respirômetro de Warburg adaptado (Van der Berg et al, 1974 e James et al, 1990)
- c - Sistemas de acumulação do biogás no espaço livre dos frascos-reatores (Dolfing & Bloemen, 1985; Dubourguier, 1989 apud Vazoller, 1989).
- d - Sistemas que se utilizam de transdutores de pressão (Shelton & Tiedje, 1984 em testes de biodegradabilidade; Collieran et al, 1991 e Cohen, 1991).

No caso c, o biogás acumulado é coletado periodicamente com seringas de trava que mantêm o gás na mesma pressão do frasco. Através de injeções destas amostras no cromatógrafo, determina-se a porcentagem de metano no volume livre do frasco-reator e, juntamente com o volume desse, calcula-se a quantidade de metano produzido. Para isso deve-se determinar uma curva padrão de metano, que relaciona os volumes desse gás injetados com as respectivas áreas dos picos, fornecidos pela cromatografia.

No sistema d, os transdutores de pressão transformam num sinal elétrico os aumentos de pressão que ocorrem no volume livre do frasco-reator, cada vez que o biogás é produzido.

Através de calibração feita com volumes de metano conhecidos e as respostas no sinal elétrico (geralmente variações de voltagem), e mais a porcentagem de metano (obtida por cromatografia), consegue-se medir as taxas de produção desse gás.

Nas medidas por sistemas de deslocamento de líquido, o metano é normalmente separado do biogás fazendo-se a retenção do dióxido de carbono através da passagem por filtros de soda cáustica (NaOH) granular e/ou borbulhamento do biogás em frascos contendo soluções desse produto (Valcke & Verstraete, 1983; de Zeeuw, 1984).

Na apresentação de cada uma das metodologias desenvolvidas para a medida da atividade metanogênica, alguns destes sistemas serão descritos com mais detalhes.

3.2.5 - Critérios para o cálculo da atividade metanogênica

Dentre os trabalhos consultados, apenas o de James et al (1990) traz um relato sobre os critérios utilizados no cálculo da atividade, a partir dos dados medidos. Os demais não mencionam os critérios de cálculo.

Acredita-se porém que, de uma maneira geral, os resultados apresentados devam ter sido obtidos a partir da construção de gráficos como os da Figura 1.

Em função da unidade utilizada, estes gráficos teriam a produção acumulada de metano por unidade de peso de biomassa na ordenada (l, ml, mmol ou μmol de CH_4 por g de SSV ou então $\text{g}(\text{CH}_4\text{-DQO}) \cdot \text{gSSV}^{-1}$ ou $\text{kg}(\text{CH}_4\text{-DQO}) \cdot (\text{kgSSV}^{-1})$ e o tempo na abcissa (minuto, hora ou dia).

De posse de curvas desse tipo a atividade metanogênica seria calculada como descrito em 3.1.2, pela tangente no trecho de inclinação máxima dessas curvas.

Entretanto, critérios para definição, como por exemplo, quais os pontos da curva que estariam dentro do trecho de inclinação máxima só foram reportados no trabalho de James et al (1990). Neste trabalho, a atividade metanogênica específica máxima foi determinada fazendo-se inicialmente uma análise de frequência destas medidas. Determinou-se o valor da atividade metanogênica específica, para cada intervalo de tempo entre as leituras de metano

produzido, em $1\text{CH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Selecionou-se uma faixa de frequência máxima destes valores. Para aqueles valores dentro da faixa selecionada de frequência máxima, foi calculada uma primeira média. Para evitar que fossem deixados de fora, valores próximos aos limites extremos da faixa selecionada, uma segunda média foi determinada, considerando as atividades dentro de uma nova faixa de mais ou menos 20% em torno da primeira média. Esta nova média era definida como o valor da atividade metanogênica específica máxima de suas medidas.

3.2.6 - Descrição das metodologias para o teste de atividade metanogênica específica

Neste item será apresentada uma revisão das metodologias propostas por diversos autores para a realização do teste de atividade metanogênica específica.

Algumas destas, como as desenvolvidas por Valcke & Verstraete (1983); de Zeeuw (1984); Dolfig & Bloemen (1985) e James et al (1990) serão apresentadas com maior destaque, pois foram trabalhos que se preocuparam com estudos sobre a metodologia do teste.

Outras metodologias como as de Dubourguier (1989) apud Vazoller (1989), Soto et al (1991), Visser et al (1991) e Colleran et al (1991) que foram adotadas por esses autores, serão também abordadas, uma vez que foram descritas em detalhes nestes trabalhos.

É necessário observar que todas estas metodologias são referentes às medidas de atividade metanogênica específica em relação à quantidade de biomassa expressa em termos de sólidos suspensos voláteis.

3.2.6.1 - O trabalho de Valcke & Verstraete (1983)

Valcke & Verstraete (1983) utilizaram-se de medidas da atividade metanogênica específica com a finalidade de estimar a biomassa metanogênica acetoclástica em lodos anaeróbios.

O método proposto consistiu na determinação da taxa máxima de produção de metano por litro de solução, através da adição de quantidades crescentes de acetato a uma série de amostras de lodo. Este método baseou-se em testes que mostraram que durante um tempo máximo de incubação, o crescimento da biomassa seria mínimo. Outra constatação foi que as taxas de conversão de substrato obedeciam cinética de ordem zero, não sendo assim afetadas pelas concentrações de substrato, dentro de certos limites. Além disso, assumiu-se que para as condições do teste, seria atingida a atividade metanogênica acetoclástica máxima.

Baseados em estudos com culturas enriquecidas acetoclásticas e dados de literatura (Tabela 02) os autores adotaram, para fins práticos do teste, o valor de $1000 \text{ ml CH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para a atividade específica máxima dessas culturas à 30 a 35°C.

De posse dos dados de atividade específica obtidos nos testes com um determinado lodo e, comparados com a atividade específica máxima de culturas enriquecidas, estimou-se a porcentagem de bactérias metanogênicas do lodo.

Foram usadas duas culturas anaeróbias enriquecidas em laboratório, empregando-se acetato como substrato. Ambos eram provenientes de lodo de um reator piloto de 12 m^3 , que tratava água residuária de uma destilaria. Este reator fora inoculado com lodo anaeróbio de uma instalação de tratamento de esgoto doméstico.

Tabela 02 - Atividades específicas máximas de bactérias metanogênicas acetoclásticas de algumas culturas axênicas e de lodos metanogênicos crescidos em acetato

Culturas axênicas:	Temperatura °C	Atividade Máxima $\text{mlCH}_4.\text{gSSV}^{-1}\text{dia}^{-1}$
<i>Methanosarcina barkeri</i>	37	1048
<i>Methanosarcina cepa 227</i>	35	743-933
Culturas enriquecidas		
Acetoclásticas	30	745
	30	1800
	30	1100
	35	717-896
	35	3020
	35	900
	35	930

Fonte: VALCKE & VERSTRAETE, 1983

Nas duas culturas o meio continha os seguintes componentes por litro de solução:

3,0 g de NaHCO_3 ; 0,1 g de $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$; 3,0 g de KH_2PO_4 ; 0,1 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; 3,0 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de extrato de levedura; 1,0 g de $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$; 1ml de $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$; 1,0 g de $\text{NH}_4.\text{Cl}$

Estas culturas assim enriquecidas produziram 900 e 930 ml de $\text{CH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, respectivamente.

O lodo testado foi proveniente de um reator de fluxo ascendente tratando água residuária de uma indústria de maceramento de linho. Adicionou-se diferentes concentrações de acetato de sódio ao lodo e monitorou-se a produção de metano por um período de 30 horas.

Na Figura 4 está representado o conjunto reator-retentor de CO_2 - gasômetro utilizado para o teste.

Figura 4 - Conjunto reator-retentor de CO_2 - gasômetro utilizado nos testes de atividade metanogênica (Valcke & Verstraete, 1983).

Os resultados desse teste são mostrados na Tabela 3 e nas Figuras 5 e 6. Com eles os autores concluíram:

-as taxas de produção de metano são lineares, variando entre 275 a 425 $\text{mlCH}_4/\text{l.dia}$ (Figura 5).

-concentrações mais altas de lodo conduzem a taxas maiores de produção de metano (Figura 6).

-para este lodo em particular, o acetato é limitante abaixo de 0,40 gHAc/gSSV ;

Tabela 3: Produção de metano (num período de 24 horas) de lodo de reator de fluxo ascendente, alimentado com acetato de sódio, relacionada a diferentes concentrações de lodo e carga (Valcke & Verstraete, 1983)

Concen- tração do lodo (gVSS/l)	Concen- tração inicial de HAc (g/l)	Relação carga/lodo inicial (gHAc/gSSV)	mlCH ₄ / gSSV.dia	mlCH ₄ /gHAc adicionado
4,4	1,24	0,3	76,1	253
4,4	2,48	0,6	79,5	132
4,4	3,92	0,9	98,5	109
6,1	1,24	0,2	71,3	351
6,1	2,48	0,4	98,4	242
6,1	3,72	0,6	103,3	169

Fonte: VALCKE & VERSTRAETE (1983)

Figura 5: Linearidade da produção CH₄ em 30h. Concentração inicial do lodo: 4,4 gSSV/l (Valcke & Verstraete, 1983).

Figura 6: Linearidade da produção de CH_4 em 30h. Concentração de lodo: 6,1 gSSV/l (Valcke & Verstraete, 1983).

- para assegurar condições não limitantes, deve-se diluir o lodo até a concentração de 5g/l de SSV ou menos, ou, aumentar a concentração de acetato. Segundo os autores, a segunda solução não seria aconselhável, pois a adição de quantidades maiores de acetato a lodos concentrados pode reduzir a atividade por causa de alterações no pH e nos sais do meio. Além disso, adições de quantidades maiores do que 3,72 gHAc/l não resultaram em aumento da taxa ? produção de metano;

- com base na hipótese de que a atividade específica máxima das metanogênicas acetoclásticas desse lodo seja igual a $1000\text{mlCH}_4/\text{gSSV.dia}$ e, considerando-se a sua atividade máxima real medida, os autores concluíram que estas bactérias constituíam 9,9 a 10,3% da quantidade de SSV do lodo proveniente do reator de indústria de maceração de linho.

3.2.6.2 - O trabalho de Willem de Zeeuw (1984)

No trabalho de de Zeeuw (1984), foram estudados diversos aspectos da metodologia do teste de atividade metanogênica específica. Esse parâmetro foi fundamental para o desenvolvimento de sua pesquisa, que tratava da aclimação de lodo anaeróbio para a partida de um reator de fluxo ascendente e manta de lodo.

Deve-se destacar alguns aspectos estudados por esse pesquisador, cujos resultados o levaram a definir a metodologia dos testes de atividade. Na figura 7, vê-se o conjunto reator - filtro de soda - gasômetro utilizado nos testes.

Uma primeira preocupação foi com a possibilidade de crescimento da biomassa, já discutida no item 3.2.2. De Zeeuw (1984) observou também a correlação entre a quantidade de coenzima F₄₂₀ e a atividade metanogênica.

Figura 7 - Conjunto reator - filtro de soda - gasômetro usado por de Zeeuw em seus testes de atividade (de Zeeuw, 1984).

Além disso, um estudo que mereceu aprofundamento maior, com respeito à metodologia usada, foi o relacionado com o fenômeno da fase "lag" de produção de gás.

Segundo de Zeeuw (1984), a fase "lag" é caracterizada por um período em que as taxas de conversão de substrato a metano são muito baixas. Ela foi verificada no início dos testes de atividade, e seria motivada por uma série de fatores, como mudanças no meio onde se encontram as

bactérias ou pela quantidade de inóculo empregada no início dos ensaios (Kulkarni et al, 1979 apud de Zeeuw, 1984).

Uma mudança na composição do substrato pode também induzir à fase "lag", se houver necessidade de sintetizar novas enzimas (Pament et al, 1978 apud de Zeeuw, 1984) ou um número mais adequado de bactérias (Chynoweth et al, 1979 apud de Zeeuw, 1984).

Outros fatores como a presença de compostos inibidores no meio, por exemplo amônia em altas concentrações (Van Velsen, 1979 apud de Zeeuw, 1984), e a estocagem do lodo (de Zeeuw, 1984) podem levar ao aparecimento da fase "lag".

Em resumo, a influência de vários destes fatores na duração da fase "lag" foi investigada por de Zeeuw (1984), sendo eles:

- a atividade metanogênica própria do lodo;
- o período de estocagem do lodo;
- a intensidade de mistura
- a composição e concentração dos ácidos voláteis usados como substrato
- o pH inicial do teste
- a presença de substâncias inibidoras como, oxigênio, sulfeto e amônia.

Inicialmente, a fase "lag" foi mais precisamente definida como o tempo extra requerido para se digerir o substrato, quando comparado ao tempo que se gastaria se a taxa de degradação fosse a máxima desde o início do teste.

Com base nesta definição, de Zeeuw (1984) adotou em sua pesquisa, que a duração da fase "lag" seria medida pelo tempo extra requerido para a produção de 0,2 kg(CH₄-DQO) por m³ de volume de digestor.

A seguir serão apresentados os resultados do efeito de cada um daqueles fatores na duração da fase "lag" dos testes de atividade metanogênica específica.

- Efeito da atividade metanogênica do lodo

Foram realizados testes utilizando-se lodos com diversas atividades. Os resultados estão resumidos na Figura 8, de onde se concluiu que a fase "lag" diminui com o aumento da atividade metanogênica do lodo, isto é, com o aumento das concentrações de biomassa ativa.

Figura 8 -Relação entre a fase "lag" e a atividade metanogênica para 9 amostras de lodo de digestor de esgoto (x) sendo uma delas ensaiada com quatro concentrações diferentes de lodo (+) (de Zeeuw, 1984)

- Armazenamento do lodo sem alimentação

Armazenou-se lodo de digestor de esgoto à 4°C durante 1 ano e meio, após a coleta em diferentes digestores. Foram realizados, então, testes de atividade com parte desse lodo armazenado. Os resultados dessas medidas estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 04: Influência do período de armazenamento do lodo de digestor de esgoto à 4°C na fase "lag" e na sua atividade do metanogênica.

Tipo de Lodo	Tempo de armazenamento (dias)	Fase "lag" (dias)	Atividade específica máxima $\text{g}(\text{CH}_4\text{-DQO}) \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$
a	2	1,5	0,17
	199	2,9	0,20
	294	3,3	0,12
	338	4,7	0,17
	499	5,5	0,16
	535	7,5	0,16
b	3	2,7	0,14
	77	7,5	0,12
	243	14,7	0,06

Fonte: de ZEEUW, 1984

Obs.: a e b são lodos de digestor de esgoto doméstico coletados em épocas e instalações de tratamento diferentes (Ver Tabela 1, cap. 4, de Zeeuw, 1984).

- Influência da agitação mecânica

O efeito na fase "lag" do modo de agitação (intermitente ou contínuo), bem como a intensidade de agitação, foi investigado para lodos de digestor de esgoto alimentados com diferentes tipos de ácidos voláteis. A Figura 9 mostra os resultados de uma série representativa desses experimentos com propionato como substrato, e a tabela 5, os resultados com todos os ácidos testados (acético, propiônico e butírico).

Figura 9 - Influência da agitação na fase "lag" da produção de gás na digestão de propionato (de Zeeuw, 1984).

(___): produção de metano;

(----): concentração de propionato

Tabela 5 - Influência do modo de agitação na duração da fase "lag" para diferentes ácidos voláteis em reatores descontínuos (1)

Agitação	Duração da fase "lag" na digestão de:					
	acetato		butirato		propionato	
	dias	relação: condição (3) e demais	dias	relação: condição (3) e demais	dias	relação: condição (3) e demais
nenhuma (2)	3,0	(0,9)	3,7	(0,85)	8,3	(0,85)
intermitente; 140rpm (3)	3,4	(1,0)	4,5	(1,0)	9,8	(1,0)
contínua; 40rpm	5,7	(1,7)	8,75	(1,0)	17,3	(1,75)
contínua; 200rpm (4)	8,1	(2,4)	11,2	(2,6)	22,4	(2,3)

Fonte: de ZEEUW (1984)

(1) volume do digestor: 5,5 ℓ ; concentração do lodo $1,8 \pm 0,2 \text{ gSSV.m}^{-3}$; concentração de acetato e butirato: $1,5 \text{g.m}^{-3}$; concentração de propionato: $0,25 \text{g.m}^{-3}$.

(2) nenhuma agitação mecânica; agitação manual uma vez ao dia antes da leitura.

(3) 30s a 140rpm seguida de 5 min de pausa.

(4) agitação contínua a 200 rpm.

A fase "lag" foi mais curta quando não foi aplicada qualquer agitação. A agitação intermitente aumentou a fase "lag" de 10 a 15%. O efeito da agitação contínua, comparada com a intermitente, foi mais acentuado. A contínua resultou em um aumento de 50 a 85% da fase "lag", a uma rotação de 40 rpm. Em velocidade de 200 rpm, a fase "lag" foi de 110 a 150% maior, mostrando o forte efeito da intensidade de agitação.

Outra constatação dos experimentos, foi com respeito à influência do pH inicial (pH₀) na fase "lag", associada ao modo de agitação. Os dados da Tabela 6 mostram que o efeito da agitação foi bem menor em um pH inicial de 7,0 do que de 6,1. Outra conclusão foi que a digestão de propionato conduziu a uma fase "lag" maior, do que a do acetato, assim como a do butirato.

Tabela 06 - Influência do modo de agitação e do pH inicial na duração da fase "lag" em reatores descontínuos

Substrato	pH inicial	razão da duração da fase "lag" sem agitação: com agitação intermitente
propionato ($1,2 \text{Kg.m}^{-3}$)	7,0	1:1,16
	6,1	1:1,51
acetato+propionato (1,5 e $1,2 \text{Kg.m}^{-3}$)	7,0	1:1,08
	6,1	1:1,50

Fonte: de ZEEUW (1984)

- Efeito da concentração inicial de substrato

Três séries de experimentos foram realizadas para estudar a influência da concentração inicial de substrato na fase "lag" de produção de gás. A tabela 7 apresenta os resultados observados.

Para o lodo tipo "A", alimentado com água residuária de indústria de açúcar de beterraba (predominantemente acetato e propionato), não foi observada qualquer variação na duração da fase "lag", para relativamente altas concentrações de lodo usadas, e, relativamente baixas concentrações de substrato estudadas.

Na segunda série de experimentos, com outro tipo de lodo de esgoto, (B), o efeito da concentração inicial de substrato teve pouca influência na duração da fase "lag", à exceção da concentração de $3,9 \text{ kgDQO.m}^{-3}$. Segundo de Zeeuw (1984), o resultado de 23 dias de fase "lag", observado para essa concentração, pode ser devido ao provável abaixamento do pH inicial ocorrido durante o teste.

Na terceira série de experimentos, já com outro tipo de lodo de esgoto, (C), foi utilizado apenas propionato como substrato. Nesse caso, houve um relativo aumento da fase "lag" de 9,1 dias para 12,9 dias, quando a concentração de propionato aumentou de 0,45 a $2,73 \text{ kgDQO.m}^{-3}$ (ver Tabela 7).

Tabela 07- Influência da concentração inicial de substrato na duração da fase "lag".

Lodo de digestor de esgoto		Substrato		Fase "lag" (dias)
Tipo	Concentração (kgSSV.m ⁻³)	Tipo	Concentração (kgDQO.m ⁻³)	
A	5,6	Resíduo de usina de açúcar de beterraba	0,2	0,35
	5,6		0,6	0,35
	5,6		1,6	0,35
B	8,45	Acetato + propionato + butirato	0,5	4,7
	8,45		0,9	4,2
	8,45		1,8	6,2
	8,45		3,9	23,0
C	2,0	propionato	0,45	9,1
	2,0		0,9	10,7
	2,0		1,8	11,6
				2,75

Fonte: de ZEEUW (1984).

Obs.: Lodos A, B e C (ver Tabela 1, cap. 4, de Zeeuw, 1984)

Outro estudo mostra que a fase "lag" praticamente desaparece quando uma segunda alimentação é fornecida, após a completa digestão da primeira alimentação (Tabela 8).

Tabela 08 - Fase "lag" em reatores descontínuos para uma primeira e uma segunda alimentação

Tipos de lodo de esgoto	Fase "lag" (dias)	
	primeira alimentação	segunda alimentação
G	2,3	0,5
B	2,9	0,25
I	4,2	1,0
J	10,2	0,7

Fonte: de ZEEUW (1984).

Obs.: Lodos G, B, I, J (ver Tabela 1, cap 4, de Zeeuw, 1984)

- Efeitos de outros fatores

Foi investigada também a influência de outros fatores como pH inicial, concentração de amônia, oxigênio e sulfeto, na duração da fase "lag" do teste de atividade.

Os resultados são mostrados nas Tabelas 9, 10 e 11 e na figura 10.

Tabela 09 - Efeito do pH inicial na duração da fase "lag" em reatores descontínuos

Experi- mento	Substratos (kg/m ³)			Conc. de lodo (kgSSV/m ³)	pH ₀	Fase "lag" dias
	Acetato	Propionato	Butirato			
A	0,6	0,6	0,6	2,7	7,1	10,2
				5,3	6,2	15,4
				2,5	6,0	17,7
B	1,5	1,2	-	1,9	7,0	4,3
				1,8	6,15	7,5
C	-	1,2	-	1,9	7,0	9,9
				1,9	6,1	12,3

Fonte: de ZEEUW (1984).

Observa-se que a fase "lag" foi significativamente maior, quando o pH inicial foi de 6,0 a 6,2 do que para pH igual a 7,0.

A Tabela 10 mostra que concentrações de amônia acima de 1,21 kgNH₄⁺ - N/m³ aumentaram rapidamente a duração da fase "lag".

Tabela 10 - Efeito da concentração de amônia na duração da fase "lag" em reatores descontínuos.

Concentração de amônia ($\text{kgNH}_4^+ - \text{N/m}^3$)	Fase "lag" (dias)
0,74	1,3
1,21	3,4
2,36	26
3,52	34
4,99	48

Fonte: de ZEEUW (1984).

Os resultados mostraram que a adição de 2,6 ou 5,2 mM de sulfato ($0,25$ a $0,5\text{kg SO}_4^{-2}/\text{m}^3$) afetou pouco a fase "lag".

Contrariamente à adição de sulfato, a adição direta de 2,8mM de sulfeto de potássio, causou uma considerável extensão da fase "lag" que foi de 34 dias. No experimento E, onde foi adicionado sulfato mais sulfeto, a fase "lag" foi de 39 dias.

Tabela 11 - Influência do sulfeto como sulfeto de potássio, ou sulfeto produzido através da redução de sulfato na duração da fase "lag"

Experi- mentos	Concentração em mM			Duração da fase "lag" (dias)
	Sulfato	Sulfeto		
	t = 0	t = 0	t=7 dias	
A	0	0	0	4,5
B	2,6	0	1,6	4,9
C	5,2	0	3,3	4,6
D	0	2,8	2,15	34
E	2,6	2,8	3,9	39

Fonte: de ZEEUW (1984).

o valor para $t = 0$ é o da concentração adicionada
o valor para $t = 7$ é o da concentração medida

A análise da Figura 10 mostra que a exposição do líquido do reator ao ar, fez cair acentuadamente a taxa de produção de metano. Entretanto, o fluxionamento de nitrogênio gasoso permitiu a recuperação total das taxas iniciais. Essa recuperação ocorreu, mesmo sem a utilização do nitrogênio, após 1 dia.

Este resultado permitiu a de Zeeuw (1984) afirmar que o contato do lodo de esgoto com o ar durante o transporte ou manuseio, não traz efeito adverso sobre a fase "lag" do teste, ou sobre a sua atividade metanogênica.

Figura 10: Efeito do contato do ar na taxa de produção de metano em reatores descontínuos (de ZEEUW, 1984).

- (----) reator sem exposição ao ar
- (____) reator com exposição ao ar
- (1) líquido do reator borbulhado com ar por 30min
- (2) espaço livre do reator com nitrogênio gasoso
- (3) espaço livre do reator com ar

Outras observações importantes de de Zeeuw (1984) sobre os resultados dos testes de atividade metanogênica foram:

- . após a completa digestão da quantidade padronizada de ácidos voláteis do teste, o pH aumentava para valores entre 7,3 a 7,5.
- . a fração não sedimentável de sólidos suspensos voláteis de diferentes amostras de lodo de esgoto mostrou atividades duas a três vezes maiores do que a do lodo original.
- . as atividades metanogênicas de lodo de esgoto variaram com a concentração original de SSV. Esta variação mostrou atividades iguais a $0,08 \text{ kg}(\text{CH}_4\text{-DQO}).\text{kgSSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para lodos com SSV em torno de 45 kg.m^{-3} e $0,20 \text{ kg}(\text{CH}_4\text{-DQO}).\text{kgSSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para lodos com SSV próximo à 15 kg.m^{-3} .

3.2.6.3 - O trabalho de Dolfig & Bloemen (1985)

Dolfig & Bloemen (1985) utilizaram-se de medidas da atividade metanogênica específica para estudar a composição microbiana de meios metanogênicos.

Foram determinadas as atividades em diferentes substratos, que serviram para caracterização dos diversos grupos fisiológicos presentes no lodo.

Estes grupos foram classificados de acordo com a Tabela 12, que apresenta também os substratos utilizados, bem como os valores de atividade.

Primeiramente foram feitos alguns estudos a respeito da metodologia do teste, concluindo-se que:

Tabela 12 - Atividades metanogênicas de vários grupos metabólicos de bactérias anaeróbias de importância em ecossistemas metanogênicos.

Grupo metabólico	Espécie	Substrato	Atividade específica ($\mu\text{molCH}_4.\text{gSSV}^{-1}.\text{min}^{-1}.$)
Metanogênicas hidrogenotróficas	<i>Methanobacterium formicicum</i>	H ₂	350-550
	<i>Methanobacterium bryantii</i>	H ₂	300
	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	H ₂	600
	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	H ₂	116-490-1180
	<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂	260
Metanogênica acetotrófica	<i>Methanotrix soehngenii</i>	acetato	24
Metanogênicas de funções mistas	<i>Methanosarcina barkeri</i> (Fusaro)	H ₂	200
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (DM)	H ₂	95
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (Fusaro)	acetato	30
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (Ms)	acetato	60
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (227)	acetato	170
	<i>Methanosarcina barkeri</i> (227)	acetato	23-29

Fonte: DOLFING & BLOEMEN (1985).

- a produção de metano deve ser dependente da quantidade de lodo, para uma ampla faixa de concentrações (Figura 11).

Figura 11 - Efeitos de diferentes quantidades de biomassa na taxa de produção de metano com acetato e hidrogênio e dióxido de carbono (DOLFING & BLOEMEN, 1985)

A - lodo de reator anaeróbico tratando água residuária de indústria de açúcar

B - lodo de reator anaeróbico tratando água residuária de fábrica de amido de milho.

Os autores mencionam que esta linearidade foi mais facilmente obtida, quando se utilizou o acetato como substrato. Com hidrogênio - dióxido de carbono foi necessária uma agitação vigorosa para obter os resultados, especialmente em atividades mais altas do lodo.

- As soluções de vitaminas e traços de metais podem ser eliminadas. Segundo os autores, justifica-se essa eliminação em função da realização do teste de atividade em um curto tempo, durante o qual, não deve ocorrer qualquer crescimento significativo.
- a concentração de cloreto de amônio para o teste, deve ser de 0,5g/l. Estes pesquisadores determinaram que a taxa de produção de metano foi máxima entre 500mg/l e 1500mg/l, como mostram os resultados da Tabela 13. Adotou-se assim o valor de 500 mg/l para cloreto de amônio.

Tabela 13 - Influência de NH_4Cl na medida da atividade metanogênica (a) de lodo granular

NH_4Cl (mg/l)	Taxa de produção de CH_4 (mol $\text{CH}_4 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
0	3,13 (b) $\pm$ 0,29
500	5,33 $\pm$ 0,50
1500	5,47 $\pm$ 0,40
5000	4,43 $\pm$ 0,21

Fonte: DOLFING & BLOEMEN (1985).

- (a) A atividade foi determinada com uma mistura de acetato de sódio e propionato de sódio, a 30°C e pH=7
- (b) Médias $\pm$ desvio padrão de experimentos em triplicata

- concentrações muito altas de sal, podem afetar a produção de metano. A Figura 12 exemplifica essa influência para lodo granular. A metanogênese foi inibida em 50% numa concentração de cloreto de sódio de aproximadamente 150 mM.

Figura 12 - Influência da concentração da NaCl na atividade de metanogênica acetoclástica do lodo granular (DOLFING & BLOEMEN 1985).

- O efeito do pH na atividade metanogênica de lodo granular é mostrado na Figura 13. Os experimentos foram realizados sob uma atmosfera de nitrogênio com tampão de 0,2M de fosfato. Observa-se que as maiores atividades ocorreram para pH em torno de 7,5 para os três substratos testados.

Figura 13 - Efeito do pH na atividade metanogênica de lodo granular (Dolfing & Bloemen, 1985).

- A composição do meio de crescimento influenciou o valor da atividade metanogênica da biomassa desenvolvida. É o que mostram os resultados da Tabela 14.

Tabela 14: Atividades metanogênicas de biomassa cultivadas em reatores anaeróbios utilizados no tratamento de diversas águas residuárias.

Origem da biomassa	Substratos usados para o crescimento	Atividade metanogênica ($\mu\text{mol CH}_4 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)			
		substrato dos testes			
		Hidro- gênio	Formiato	Acetato	Propio- nato
Digestor de esgoto	Esgoto	N.D.	0,3	0,3	0,1
	46% acetato + 54% propionato	15,5 $\pm$ 3,5	20,0 $\pm$ 4,0	14,0 $\pm$ 1,9	6,9 $\pm$ 1,2
	42% acetato + 48% propionato + 10% de sacarose	10,5 $\pm$ 2,1	8,5 $\pm$ 2,0	6,9 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 1,3
	20% acetato + 3% propionato + 95% sacarose	10,5 $\pm$ 1,9	6,3 $\pm$ 0,6	5,0 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,9
Reatores tratando águas residuárias de: Fábrica de amido de milho	água residuária de amido de milho	5	8	1,0	1,3
	46% acetato + 54% propionato	14,1 $\pm$ 2,4	16,7 $\pm$ 1,1	16,4 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,5
Usina de açúcar	água residuária de usina de açúcar	10	11	10	4,5

Fonte: DOLFING & BLOEMEN (1985).

- O substrato hidrogênio - dióxido de carbono pode ser substituído por formiato, sem alterar os resultados do teste.

- Aplicação do teste

Para obter informações dos grupos metabólicos da população metanogênica, foram realizados testes com acetato, hidrogênio e acetato mais hidrogênio. Os resultados estão resumidos no Tabela 15, e mostraram que as atividades metanogênicas em hidrogênio mais acetato, foram iguais à soma das atividades, em hidrogênio e em acetato, separadamente. Isto demonstra que organismos como *Methanosarcina*, não interferiram na população acetotrófica destes lodos. Caso interferissem a soma da atividade em

hidrogênio e em acetato, deveria ter sido maior do que a da mistura hidrogênio mais acetato (Dolfing & Bloemen, 1985).

Tabela 15: Comparação dos valores de atividade metanogênica com Hidrogênio, Acetato e Hidrogênio mais Acetato da biomassa cultivada em vários substratos.

substratos usados no crescimento da biomassa	Atividade metanogênica ($\mu\text{mol CH}_4/\text{gSSV}^{-1}.\text{min}^{-1}$)		
	Substratos		
	Hidrogênio	Acetato	Hidrogênio + Acetato
água residuária de usina de açúcar	10	10	20
água residuária de amido de milho	5	1	7
Acetato + propionato	13	10	24

Fonte: DOLFING & BLOEMEN (1985).

3.2.6.4 - O trabalho de James, Chernicharo e Campos (1990)

Estes pesquisadores desenvolveram estudos a respeito da metodologia do teste de atividade metanogênica específica, utilizando apenas acetato como substrato e o respirômetro de Warburg para as medidas da produção de metano.

A principal diferença do método proposto neste trabalho em relação aos demais está na forma de medida da produção de metano. Seus autores propuseram a utilização do respirômetro de Warburg, adaptado ao processo anaeróbio para essas medidas. Nessa adaptação, os manômetros utilizados nos testes aeróbios foram empregados para monitorar a produção de biogás. Além disso, foi instalado um braço lateral no frasco para amostragem do biogás e,

aumentado o seu volume de 10ml para 45ml, permitindo que se usasse um volume mais representativo de lodo no teste.

A utilização desse equipamento, segundo estes pesquisadores, possibilitava medidas mais precisas dos volumes de metano do que os sistemas de medida por deslocamento de líquido. Isto fica mais evidenciado, para medidas de pequenos volumes de biogás, como por exemplo quando são realizados testes com pouco lodo e que exibem baixa atividade metanogênica específica.

No respirômetro de Warburg utilizado, a produção de biogás é registrada através dos manômetros conectados aos frascos e lida em intervalos regulares. Para cada conjunto de amostras, um frasco controle (branco) foi também ensaiado com o objetivo de detectar quaisquer mudanças externas como na temperatura e pressão.

Análises cromatográficas do biogás foram feitas para determinar a sua composição percentual.

As leituras dos manômetros eram convertidas em volumes de biogás através da seguinte expressão (Umbreit et al, 1964 apud James et al, 1990):

$$V = K(H_f - H_c) \dots\dots\dots (5)$$

em que,

V : volume de biogás produzido (ml)

K : constante do frasco

H_F : leitura do manômetro conectado com o frasco-reator
(mm)

H_C : leitura do manômetro conectado com o frasco-controle
(mm)

A constante do frasco consistia basicamente de um fator de calibração que possibilitava a determinação da quantidade de biogás produzido através de mudanças nas pressões registradas pelos manômetros.

Segundo Umbreit, 1964 apud James et al (1990) K pode ser expresso por:

$$K = \frac{V_g \cdot 273}{T \cdot P_o} + \frac{V_f \cdot \alpha}{P_o} \dots\dots\dots (6)$$

em que,

V_g : volume da fase gasosa no frasco, incluindo os tubos de conexão até o manômetro (ml)

V_f : volume de líquido no frasco (ml)

T : temperatura absoluta do banho-maria ($273 + X^{\circ}\text{C}$)

α : coeficiente de solubilidade do gás produzido no líquido do frasco-reator ($\text{ml} \cdot \text{ml}^{-1}$)

P_o : pressão padrão do líquido que abastece o manômetro ($P_o = 10000 \text{ mm}$)

O segundo termo dessa expressão pode ser desdobrado em dois, para levar em conta o metano e o dióxido de carbono dissolvido ou combinado na fase líquida.

Assim, a expressão de K foi mostrada como:

$$K = \frac{V_g \cdot 273}{T \cdot P_o} + \frac{V_f \cdot \alpha_1}{P_o} + \frac{V_f \cdot \alpha_2}{P_o} \dots\dots\dots (7)$$

em que,

α_1 : coeficiente de solubilidade do metano no frasco-reator

α_2 : coeficiente de solubilidade do dióxido de carbono no frasco-reator.

A solubilidade do metano pode ser determinada pela expressão abaixo (Metcalf & Eddy, 1979):

$$\alpha_1 = \frac{P_g \cdot V_c \cdot N_w}{H} \dots\dots\dots (8)$$

em que,

P_g : pressão parcial de metano (atm)

V_c : volume de 1 mol do gás, corrigido para diferentes temperaturas (l)

H : constante da lei de Henry ($\text{atm} \cdot \text{mol}$)

N_w : número de moles de água contido em um litro de solução ($1000/18 = 55,6$)

A constante do frasco para medidas do metano foi assim mostrada:

$$K_m = \frac{(V_g \cdot 273/T) \cdot M + V_g \cdot \alpha_1}{P_o} \dots\dots\dots (9)$$

em que,

M : conteúdo, em %, de metano presente no gás do frasco.

Os volumes de metano foram então, medidos com a utilização das expressões (5) e (9).

A rotina dos testes de atividade até alcançar a definição de procedimentos para a sua execução, obrigou a realização de vários ensaios de ajuste da metodologia. Tais ensaios, relacionaram-se principalmente com a definição do período de adaptação do lodo, da concentração de sólidos voláteis, do intervalo de amostragem e da carga orgânica aplicada. Foram utilizadas cinco amostras de lodo, todas oriundas de reatores anaeróbios de manta de lodo, em nível de laboratório.

Em função dos resultados obtidos, foi sugerido o seguinte procedimento para a rotina dos testes, lembrando-se que para um nível maior de precisão, os pesquisadores recomendaram ensaios em duplicata para cada amostra de lodo.

- a) Determinar a concentração de sólidos voláteis do lodo a ser analisado antes do início do teste (preferencialmente 1 dia antes);
- b) Retirar lodo do digestor 12h antes do teste. Para lodos armazenados, aclimatá-los por 12h ou 24h na temperatura do teste;

- c) Adicionar o lodo no frasco e diluir as amostras com uma solução mineral (Valcke & Verstraete, 1983) até que seja alcançada a concentração de 2,5 g/l de sólidos voláteis no frasco-reator;
- d) Fluxionar com nitrogênio o espaço livre dos frascos por alguns minutos.
- f) Fechar as torneiras dos manômetros e injetar o substrato através de um septo de látex;
- g) Iniciar a agitação da amostra e fazer as leituras iniciais de biogás em intervalos de 10 a 20min, dependendo da atividade do lodo;
- h) Analisar o conteúdo do biogás através de amostragens em intervalos regulares de tempo;
- i) Determinar o volume de metano produzido por intervalo de tempo, usando-se as expressões (5) e (9) e calcular a atividade metanogênica específica a ser expressa em ($lCH_4 \cdot gSSV^{-1} \cdot dia^{-1}$).

Alguns resultados desse estudo devem ser destacados, tais como:

- . a utilização do substrato iniciou-se quase que instantaneamente (sem fase "lag") e, quando o substrato exauriu-se, a atividade caiu rapidamente;
- . a conversão do substrato em metano e dióxido de carbono foi quase completa, como mostraram as análises de DQO e ácidos voláteis ao final dos testes ou, as razões entre as quantidades de metano medidas e as teóricas esperadas (Figura 14);

- . Não foi observada qualquer correlação entre a atividade metanogênica do lodo e sua posição ao longo da altura do reator (Figura 15).
- . Também nenhuma correlação foi observada entre a carga orgânica aplicada e a atividade (Figura 16). As taxas de carga orgânica variaram de 0,25 até próximo de 2,00 g ácido acético/gSSV e as correspondentes atividades não mostraram variações significativas. Em particular, as altas taxas de carga orgânica aplicadas, não pareceram causar inibição. Os autores ressaltaram que estes resultados contradizem os da literatura, como Valcke & Verstraete (1983) e Dolfing & Bloemem (1985), e por conseguinte merecem mais investigações.
- . Como os testes indicaram trechos bem uniformes e estáveis de produção de gás na sua taxa máxima, a duração do teste poderia ser abreviada, já que não havia necessidade de continuá-la até a depleção completa do substrato, para se calcular a atividade;
- . Outra maneira de se diminuir a duração do ensaio, seria a adoção de cargas orgânicas menores na realização dos testes, desde que isso não afetasse o valor final da atividade.

Figura 14: Relação entre a produção teórica de metano esperada e a quantidade medida em testes de atividade (James et al, 1990).

Figura 15: Variação da atividade metanogênica do lodo com a sua posição de coleta no reator (James et al, 1990).

Figura 16: Relação entre a carga orgânica aplicada e a atividade metanogênica (James et al, 1990).

3.2.6.5 - Outras metodologias propostas para o teste de atividade metanogênica

Serão reportadas aqui as metodologias propostas por Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989), Bull et al (1984); Visser et al (1991) e Soto et al (1991), cujas condições do teste encontram-se resumidas na Tabela 16, ao final desse item. Também serão comentadas as condições da metodologia adotada por Colleran et al (1991).

- Na metodologia de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) a atividade metanogênica específica é medida em relação aos ácidos acético, propiônico e butírico, adicionados separadamente.

São utilizados frascos-reatores de 250ml contendo 100g de lodo para 0,1 ml de cada um daqueles ácidos, neutralizados com hidróxido de amônia.

Sem a adição de quaisquer nutrientes, estes frascos são incubados à 37°C, sob uma atmosfera de 100% de nitrogênio puro. O metano produzido, que se acumula no espaço livre do frasco, é medido através de análise cromatográfica do conteúdo do biogás, retirado de hora em hora em volumes iguais de 0,5ml. Nas coletas devem ser empregadas seringas com travas, para que as amostras gasosas se mantenham na mesma condição de pressão interna dos frascos.

Dependendo do volume do espaço livre, os volumes de metano perdidos a cada amostragem podem ser significativos. Assim, há necessidade de se calcular essa perda. Para isso, adiciona-se ao sistema um gás inerte qualquer (sem interferência com as condições de cromatografia), em uma quantidade qualquer, desde que produza um "pico" mensurável na análise cromatográfica. O mesmo valor de diminuição da quantidade de gás adicionada (padrão interno gasoso), também ocorrerá com o metano produzido. Desta maneira pode-se corrigir o efeito de amostragens sucessivas no valor do metano produzido (Vazoller 1989).

Um dos gases utilizados para este fim é o propano, podendo também ser usual o nitrogênio.

A correção pode ser feita puntualmente, ou seja, corrigindo-se o valor do metano pelo decréscimo do pico (área ou altura) do gás inerte a cada amostragem, ou, pelo valor médio destes picos, considerando-se todas as amostragens.

No primeiro caso o cálculo é feito pela expressão:

$$A_{CH_4\text{corrig}} = A_{CH_4(\text{obtida})} \times \frac{(Ap)_{\text{anterior}}}{(Ap)_{\text{obtida}}} \dots\dots\dots (10)$$

em que,

$A_{CH_4 \text{ obtida}}$: área de metano no cromatograma, obtida na amostragem a ser corrigida.

$(Ap)_{\text{anterior}}$: área do padrão interno no cromatograma, anterior à da amostragem a ser corrigida.

$(Ap)_{\text{obtida}}$: área do padrão interno no cromatograma, obtida na amostragem a ser corrigida.

No segundo caso, emprega-se a expressão:

$$A_{CH_4 \text{ corrig.}} = A_{CH_4 \text{ (obtida)}} \times \frac{(Ap)_{\text{médio}}}{(Ap)_{\text{obtida}}} \dots\dots\dots (11)$$

em que,

$(Ap)_{\text{médio}}$: valor médio das áreas do padrão interno, considerando-se todas as amostragens.

Utilizando-se o valor médio das áreas do padrão interno pode-se atenuar os erros experimentais decorrentes da coleta e análise cromatográfica. Estes erros são evidenciados quando a área do padrão interno numa amostragem, apresenta-se com valor inferior à anteriormente obtida.

De posse de uma curva de calibração, volumes de metano (100% puro) em função de suas respectivas áreas nos cromatogramas, e, áreas corrigidas de CH_4 nas amostragens, calculam-se os volumes acumulados de metano em cada alíquota amostrada.

Para o volume todo do espaço livre, ter-se-á:

$$V_{CH_4} = V_H \times \frac{(V_{CH_4})_a}{(V_a)} \dots\dots\dots (12)$$

em que,

V_{CH_4} : volume de metano acumulado no espaço livre numa determinada amostragem

V_H : volume medido do espaço livre

$(V_{CH_4})_a$: volume de metano numa determinada alíquota amostrada

V_a : volume de biogás em cada alíquota amostrada

Estes cálculos são feitos para o frasco-reator com substrato e o frasco-controle (branco).

Nessa metodologia, o resultado da atividade, denominada atividade metanogênica específica absoluta ou real, é obtido pela diferença entre a atividade metanogênica específica aparente do substrato (frasco-reator com lodo e substrato) e a atividade metanogênica específica da prova em branco (frasco-reator com lodo apenas), expresso em $\mu\text{moles CH}_4 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A quantidade de SSV, obtida pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1975) é medida apenas ao final de cada teste.

- Soto, et al (1991) utilizaram as medidas de atividade metanogênica específica para estudos de caracterização e comparação da biomassa de filtros anaeróbios mesofílicos e termofílicos. Foram usados frascos-reatores de 100ml nos seus testes de atividade. O metano produzido foi medido por sistema de deslocamento de líquido, tipo frasco Mariotte, sendo o dióxido de carbono do biogás retido numa solução 2,5% de hidróxido de amônia contida neste frasco.

Os testes foram realizados com diversas concentrações de SSV do lodo e, o substrato foi uma mistura de ácidos voláteis, acético (2,0 g/l), propiônico (0,5 g/l) e butírico (0,5g/l).

Algumas outras considerações sobre essa metodologia:

- o potencial de oxi-redução foi ajustado pela adição de 100mg/l de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, enquanto 1 g/l de carbonato de

sódio anidro foi adicionado para aumentar a alcalinidade;

- . o pH foi ajustado na faixa de 7,0 a 7,1 com soluções 1N ou 5N de ácido clorídrico e soda.
- . nenhuma adição de nutrientes foi utilizada.

Os procedimentos para realização do teste foram:

- a) Introdução nos frascos-reactores de uma quantidade prévia de água de diluição;
- b) Adição da solução redutora e de carbonato de sódio;
- c) Adição do lodo;
- d) ajuste do pH para 7,0 / 7,1;
- e) Fluxionamento da mistura de gases nitrogênio/dióxido de carbono com 85% e 15% respectivamente;
- f) Fechamento dos frascos e conexão aos dispositivos de medição do biogás;
- g) Adição dos substratos nos frascos-reactores e homogeneização com uma leve agitação manual.

Segundo estes pesquisadores, concentrações de SSV do lodo entre 1,5 e 5,0 g/l nos testes, não influenciaram o resultado final da atividade metanogênica.

- Na metodologia de Bull et al (1984) a atividade metanogênica foi determinada pela incubação de 3 cm³ de lodo à 37°C, utilizando-se como substrato apenas ácido acético na concentração de 1000 mg/l. O pH de início dos testes foi ajustado para 7,4 com uma solução de soda. Os volumes de metano foram medidos durante 2 dias através de um sistema de deslocamento de líquido:

- No trabalho de Visser et al (1991) a atividade metanogênica específica foi medida em função da temperatura (de 42 a 63°C) utilizando-se acetato, propionato ou butirato nas concentrações de 2g DQO/l. Em todos os testes foi adicionado também sulfato de sódio na concentração de 4gSO₄/l. Os frascos-reatores foram de 0,1ℓ e a concentração de SSV em torno de 3 g/l. Foi adicionado ainda a solução de nutrientes descrita na Tabela 16.

Foi realizado ainda um segundo conjunto de testes de atividade metanogênica específica em função do pH (de 6,0 a 8,4) utilizando-se acetato (2g DQO/l) e sulfato de sódio (4g SO₄/l) como substratos, numa temperatura constante de 55°C. Nos dois conjuntos de testes as taxas de metano foram medidas pela acumulação desse gás no espaço livre dos frascos-reatores e o emprego de análise cromatográfica do biogás, como descrito no trabalho de Dolfig & Bloemen (1985).

- No trabalho de Colleran et al (1991) são discutidas diversas metodologias propostas para se medir as taxas de metano produzidas durante os testes de atividade metanogênica específica como as de Van der Berg et al (1974), Valcke & Verstraete (1983), Shelton e Tiedge (1984) e Dolfig & Bloemen (1985). Posteriormente o autor apresenta uma técnica modificada do método proposto por Shelton & Tiedge com auxílio de transdutores de pressão.

O trabalho apresenta uma tabela com valores de atividade metanogênica específica obtida com lodos de diversas origens e utilizando-se substratos como acetato, propionato, butirato, metanol, etanol e hidrogênio e dióxido de carbono. Entretanto o trabalho não esclarece detalhes da metodologia do teste, como: temperatura, concentração de SSV, concentração de substrato, pH, nutrientes e forma de agitação.

A seguir apresenta-se a Tabela 16 em que estão resumidas as diversas metodologias discutidas nesta revisão.

Tabela 16 - Resumo das metodologias do teste de atividade metanogênica específica desenvolvidas por diversos pesquisadores

Autores	Temperatura do ensaio (°C)	Sistema de controle da temperatura	Sistema de remoção do CO ₂ do biogás	Sistema de medição do metano	Agitação	Volume dos reatores (l)	Concentração de nutrientes (mg/l)	Concentração de SSV do teste (g/l)	Concentração de substrato do teste	pH de início do teste
Valcke & Verstraete (1983)	30	Incubadora	Solução 1N de NaOH no gasômetro	Sistema de deslocamento de líquido	Intermittente: 5min, cada 30min.	Volume Total: 2,0 Volume Útil: 1,0	(1) KH ₂ PO ₄ - 2500 K ₂ HPO ₄ - 1000 NH ₄ Cl - 1000 Mg.Cl ₂ - 1000 ext. levedura 200 Na ₂ S.7H ₂ O-100	5,0	(2) 0,3 a 1,0g HAC/gSSV ou 1,5g/l a 5,0 g/l de ácido acético	6,7
Bull, Sterritt e Lester (1983)	37	Incubadora	o trabalho não esclarece	sistema de deslocamento de líquido	o trabalho não esclarece	o trabalho não relata	o trabalho não relata	3,0 cm ³ de lodo	1,0 g/l de ácido acético	7,4 ± 0,2
de Zeeuw, W. J. (1984)	30	frascos-reatores em banho termostatizados	Filtro de soda granular e/ou solução a 1% de NaOH no gasômetro	Sistema de deslocamento de líquido, tipo frasco Mariotte	Intermittente: 15 a 140 rpm, cada 5-10 min	2,5 ou 5,0; ocasionalmente 0,1	(NH ₄) ₂ .SO ₄ - 13,6 NH ₄ .Cl - 73,6 KH ₂ PO ₄ - 13,6 Solução de metais segundo Zehnder: 1ml/l	2,5	Acetato: 0,6 g/l Propionato: 0,6 g/l Butirato: 0,6 g/l	7,0 a 7,1

Tabela 16 - Resumo das metodologias de teste de atividade metanogênica específica desenvolvidas por diversos pesquisadores (continuação)

Autores	Temperatura do ensaio (°C)	Sistema de controle da temperatura	Sistema de remoção do CO ₂ do biogás	Sistema de medição do metano	Agitação	Volume dos reatores (l)	Concentração de nutrientes (mg/l)	Concentração de SSV do teste (g/l)	Concentração de substrato do teste	pH do início do teste
Dolfing & Bloemen (1985)	30	Banho termostaticizado	Não remove	Acumulação do biogás no espaço livre dos frascos-reatores e análise cromatográfica de seu conteúdo	Agitador de mesa "Shaker"	Volume Total: 0,130 Volume Útil: 0,040 + 100 a 1000mg de lodo + substrato (1a)	Solução tampão NH ₄ .Cl - 500 K ₂ HPO ₄ - 400 NaHCO ₃ -10000	100 a 1000mg de lodo	20 a 50mM de acetato ou propionato ou formiato	7,0
Dubourguier (1989) apud Vazoller, (1989)	35-37	Banho termostaticizado Incubadora	Não remove	Acumulação do biogás no espaço livre dos frascos-reatores e análise cromatográfica de seu conteúdo	Agitador de mesa "Shaker"	Volume Total: 0,250 Volume Útil: 0,100	Não utilizou	a mesma da amostra de lodo	P/ cada 100g de lodo 0,1 ml de acetato, 0,1ml de propionato e 0,1 ml de butirato, adicionados separadamente	Não estabelecido
James, Cherni-charo e Campos (1990)	35	Banho termostaticizado	Não remove	Respirômetro de Warburg modificado	Continua	Volume Total: 0,045 Volume Útil: 0,035	De acordo com Valcke & Verstraete (1983). Usa aquela solução mineral estoque.	2,5	Somente acetato de 0,25 a 1,73 gHAC/gSSV	6,8

Tabela 16 - Resumo das metodologias de teste de atividade metanogênica específica desenvolvidas por diversos pesquisadores (continuação)

Autores	Temperatura do ensaio (°C)	Sistema de controle da temperatura	Sistema de remoção do CO ₂ do biogás	Sistema de medição do metano	Agitação	Volume dos reatores (l)	Concentração de nutrientes (mg/l)	Concentração de SSV do teste (g/l)	Concentração de substrato do teste	pH do meio inicial
Soto, Méndez e Lema (1991)	Mesofílica 37 e Termofílica 55	o trabalho não esclarece	Solução 2,5% de NaOH no frasco Mariotte	Sistema de deslocamento de líquido, tipo frasco Mariotte	Apenas homogeneização com leve agitação	Volume Total: 0,100 Volume Útil: não esclarece	Na ₂ S.9H ₂ O : 100 + sol. de Na ₂ CO ₃ : 1000 p/ aumentar a alcalinidade	2,19 a 6,62	Acetato 2,0g/l Propionato 0,5 g/l; Butirato 0,5g/l	7,0 a 7,1
Visser, Gao e Lettinga (1991)	40 a 70 (1b)	o trabalho não esclarece	Não remove	Acumulação do biogás no espaço-livre e análise cromatográfica de seu conteúdo	Não esclarece	Volume Total: 0,100 Volume Útil: não esclarece	NaHCO ₃ :100000 K ₂ HPO ₄ : 3000 KH ₂ PO ₄ : 4000 (10 ml/100ml) sol.nutriente basal de elementos traço: 10ml/l	± 3,0	Acetato ou Propionato ou Butirato todos com 2,0 gDQO/l	5,0 a 8,4 (2a)

- (1) concentrações da solução estoque. Esta solução era misturada com o lodo até que a concentração do meio atingisse 5 g/l
- (1a) eram adicionados no frasco-reator de 130ml, 40 ml da solução tampão preparada sob anaerobiose mais lodo em quantidades de a 1000mg (os autores não relatam a concentração de SSV do lodo) e os substratos até alcançar a concentração final de 20 a mM.
- (1b) A atividade metanogênica foi estudada para essa faixa de temperatura, para os três ácidos voláteis.
- (2) Nos ensaios foi pesquisada a relação ótima gHAC/gSSV para o teste.
- No trabalho de Valcke & Verstraete (1983), fluxionou-se N₂ no meio por 1 minuto. O mesmo foi feito no trabalho de de Zo (1984), porém não foi relatado por quanto tempo foi o fluxionamento.
- (2a) A atividade metanogênica foi estudada para essa faixa de pH, apenas para o acetato. No trabalho de Soto et al (1991) borbulhava-se uma mistura de gases (85% N₂, 15%CO₂) para redução do meio.

3.3 - Análise crítica das metodologias de medida da atividade metanogênica específica apresentadas.

3.3.1 - Análise Crítica

A revisão da literatura apresentada mostra uma utilização crescente das medidas de atividade metanogênica específica nos estudos do processo de digestão anaeróbia.

Entretanto, observa-se que as metodologias propostas para a medida desse parâmetro divergem em diversos aspectos (Tabela 16). Dentre estes, os mais conflitantes são os que se referem à temperatura do ensaio, agitação, utilização de nutrientes, concentração de SSV do lodo e principalmente a natureza e concentração do substrato para o teste.

Isto deixa claro, que falta uma uniformização de procedimentos para a sua realização e que é preciso estudar a sua metodologia no sentido de buscar uma padronização para o teste.

Numa análise das metodologias que foram revisadas destacam-se os seguintes aspectos:

- . Alguns pesquisadores desenvolveram suas metodologias considerando apenas a população metanogênica acetotrófica, já que as atividades foram obtidas somente em acetato como fonte de carbono (Valcke & Verstraete, 1983; Bull et al, 1984 e James et al, 1990).
- . Outros pesquisadores desenvolveram suas metodologias utilizando-se outros substratos além do acetato, e adicionados separadamente (Dubourguier, 1989 apud Vazoller, 1989 e Visser et al, 1991).

Em ambos os casos, a atividade metanogênica foi restrita a alguns grupos ou espécies de bactérias, não se

considerando a atividade de toda a população mista presente no lodo.

Em alguns trabalhos, as medidas de metano foram realizadas com equipamentos mais sofisticados, como cromatógrafo (Dolfing & Bloemen, 1985; Dubourguier, 1989 apud Vazoller, 1989 e Visser et al, 1991) e transdutores de pressão (Cohen, 1991; Collieran et al, 1991). Em outros, foram utilizados dispositivos mais simples como os sistemas de deslocamento de líquido (Valcke & Verstraete, 1983, de Zeeuw, 1984, James et al, 1990 e Soto et al, 1991).

Apesar da possibilidade de obtenção de medidas mais precisas com aqueles sistemas mais sofisticados, acredita-se que, tomados os devidos cuidados, os sistemas de deslocamento de líquido podem também ser eficientes, justificando a sua utilização pela simplicidade.

Em todas as metodologias pesquisadas, foram utilizados equipamentos mecanizados para agitação do meio nos frascos-reatores. Em alguns destes, a agitação foi contínua e em outros intermitente. A possibilidade de utilização de agitação manual ou mesmo a supressão da agitação é um estudo que deve ser feito pois pode conduzir a uma simplificação do teste de atividade metanogênica.

A utilização de frascos-reatores com volumes úteis maiores (2,5 ou 5,0 l por de Zeeuw, 1984) pode dificultar a realização do teste devido ao grande volume de lodo necessário. Isto ocorre, por exemplo, quando são estudados lodos de reatores pequenos a nível de laboratório. Por outro lado, reatores com volumes úteis muito pequenos, conterão menos lodo e por conseguinte, as taxas de metano produzido podem tornar-se muito pequenas, dificultando as suas medidas.

A maioria dos pesquisadores adotaram concentrações de lodo entre 2,5 e 5,0g/l em termos de SSV (Valcke & Verstraete, 1983; de Zeeuw, 1984; James et al, 1990; Visser et al, 1991 e Soto et al, 1991) para o teste.

Apesar das considerações de de Zeeuw (1984) para a escolha dessa faixa, acredita-se que concentrações maiores devam ser investigadas, pois podem reduzir o tempo de

ensaio e diminuir a porcentagem de crescimento bacteriano durante o teste, como demonstram os cálculos teóricos desse pesquisador.

A utilização de uma única relação entre a quantidade de biomassa e de substratos para o teste de atividade parece não ser a mais adequada para lodos de quaisquer origens e com quaisquer atividades. É bem possível que para alguns lodos esta relação seja inibitória e para outros, principalmente, seja limitante. Dessa forma a atividade medida não representaria a máxima atividade metanogênica do lodo.

Por último, faz-se uma crítica à falta de definição de um procedimento padrão para o cálculo da atividade metanogênica específica.

3.4 - Determinação de Ácidos Voláteis e Composição do Biogás por Cromatografia em Fase Gasosa

Na análise cromatográfica em fase gasosa devem merecer especial atenção:

- a escolha da coluna adequada
- a definição do tipo de detector a ser empregado
- a natureza e velocidade do gás de arraste
- a temperatura da coluna

Segundo Ciola (1985), dentre os dois tipos de colunas normalmente empregadas, as capilares são muito mais eficientes do que as empacotadas com respeito à separação dos constituintes da amostra analisada.

Dentre os detectores, os principais são o Detector de Condutividade Térmica (DCT), que é do tipo universal e o Detector de Ionização de Chama (DIC), que é do tipo seletivo, pois só detecta substâncias orgânicas que contêm hidrogênio ligado a carbono.

Uma característica importante dos detectores na análise quantitativa é a sua linearidade, representada pelo trecho em que a área do pico responde linearmente à massa injetada. A esse trecho dá-se o nome de território linear do detector e à relação entre a maior massa do trecho linear e a menor massa detectada neste trecho, dá-se o nome de faixa dinâmica linear.

No DIC a faixa dinâmica linear é da ordem de 10^7 e no DCT, da ordem de 10^4 (Ciola, 1985).

Quanto à natureza e velocidade do gás de arraste, é necessário que a escolha seja feita de acordo com as características do detector, o custo, a inércia e a sua resposta.

Segundo Ciola (1985), diversos detectores podem usar hidrogênio, nitrogênio, argônio ou hélio e, neste caso, observados os cuidados de segurança, o hidrogênio é o mais recomendado, pois executa a análise em menor tempo.

A velocidade ótima do gás de arraste deve ser escolhida em torno do mínimo de H (altura equivalente a um prato teórico) observado na curva que relaciona este parâmetro à velocidade do gás de arraste (u) - Figura 17 - Ciola (1985), já que quanto menor o valor de H , melhor será a resolução e por conseguinte melhor a separação dos compostos da amostra analisada.

Figura 17 - Variação da eficiência da coluna com a velocidade do gás de arraste (Ciola, 1985).

Já a temperatura da coluna tem efeito sobre diversos fatores relacionados com a sua eficiência. Entretanto, este efeito é difícil de se prever. Para algumas colunas a eficiência aumenta com a temperatura, em outras passa por um mínimo para depois aumentar.

A temperatura da coluna é, portanto, um parâmetro a ser pesquisado na otimização das condições de operação. Esta pesquisa pode conduzir à necessidade de utilização da

cromatografia com temperatura programada, ao invés de isotérmica.

Segundo Ciola (1985), existe uma preferência para operações isotérmicas nas análises de rotina, quando se analisam misturas simples (poucos componentes e faixa de ebulição estreita). A análise de misturas de muitos componentes e de longo espectro de ebulição requer o uso de colunas de alta eficiência (colunas capilares de sílica) e uma variação conveniente da temperatura de acordo com um programa.

3.4.1 - Metodologias para determinação de ácidos voláteis por cromatografia a gás.

A quantidade de ácidos voláteis totais na digestão anaeróbia é um parâmetro importante para o controle da operação de reatores anaeróbios.

Segundo Vieira & Souza (1985), a medida dos ácidos voláteis é o parâmetro que fornece, juntamente com a medida do volume de gases produzidos, a indicação mais imediata do funcionamento do processo e deve ser acompanhada com muito rigor e atenção.

A experiência tem mostrado que um rápido e inesperado aumento da produção de ácidos, normalmente indica uma tendência à interrupção do processo, (Andrews et al, 1964). Entretanto, afirmam estes pesquisadores que a quantidade individual destes ácidos pode ser um indicador ainda melhor das condições do reator, do que sua quantidade total.

Em se tratando da digestão de resíduos líquidos, os ácidos mais comuns são o acético, o propiônico e o butírico (Dinopoulou et al, 1988). Também podem estar presentes, o fórmico, o valérico, o isobutírico e o capróico, geralmente em menor quantidade.

A técnica de análise mais utilizada na determinação dos ácidos voláteis da digestão anaeróbia é sem dúvida, a por cromatografia a gás (como pode ser visto na Tabela 17).

O primeiro uso da cromatografia para este fim, reportado pela literatura, foi em 1952 por James & Martin apud Andrews et al, (1964).

Atualmente, a definição da metodologia geral de análise de ácidos voláteis por cromatografia a gás envolve, a coleta, a preparação e preservação da amostra e a fixação dos parâmetros cromatográficos relacionados com a separação, identificação e quantificação dos ácidos.

Estes parâmetros são, principalmente:

- o tipo de coluna (empacotada ou capilar)
- natureza do suporte e da fase estacionária
- dimensões da coluna
- o tipo de detector
- a natureza do gás de arraste
- as temperaturas da coluna (isotérmica ou programada), do detector e do injetor
- a vazão do gás de arraste
- a vazão dos gases da chama (para o DIC)
- o volume de amostra a ser injetado

A Tabela 19 apresenta alguns valores destas condições retiradas da literatura de tratamento de resíduos por processos de digestão anaeróbia.

A análise destes dados mostra que:

- a quase totalidade dos autores listados utilizaram-se de colunas de vidro do tipo empacotadas, notadamente as do tipo "chromossorb", com comprimento em torno de 2,0m e diâmetro em torno de 2mm;
- o detector foi sempre o de ionização de chama;

- o nitrogênio foi o gás de arraste utilizado por quase todos os pesquisadores;
- a temperatura da coluna foi na maioria das vezes isotérmica;

Estas observações mostram que, com base no que foi apresentado em 3.4, e, em se tratando da análise de compostos com vários constituintes e de largo espectro de ebulição, estas condições não são as mais recomendadas. Neste caso, a literatura recomenda principalmente, colunas capilares com comprimentos acima de 10m e temperatura programada, para se obter melhores resoluções. Outra recomendação seria a utilização do hidrogênio como gás de arraste, para maior rapidez da análise (Ciola 1985).

Nos trabalhos de Andrews, Thomas e Pearson (1964), Vieira & Souza (1985) e Unger, Voznáková e Páca (1977) são apresentados cromatogramas típicos, que podem ser vistos nas Figuras 18, 19 e 20, com as condições cromatográficas mostradas na Tabela 17.

Figura 18 - Cromatograma com a separação dos ácidos voláteis obtido por Andrews et al (1964).

Figura 19 - Cromatograma com a separação dos ácidos voláteis obtido por Vieira & Souza (1985).

Figura 20 - Cromatograma de ácidos voláteis obtido por Unger et al (1977)

Quanto à preparação das amostras, Andrews et al (1964) afirmaram que ela deve ser clarificada, por filtração ou centrifugação, antes da injeção na coluna. Foram usadas membranas de filtro com tamanho do poro igual a $0,45\ \mu\text{m}$ e filtração à vácuo dentro de 5 minutos após a coleta. Estes autores afirmaram ainda, que se a filtração requerer maior tempo ou, se a injeção não for imediata, os ácidos devem ser convertidos em seus sais não voláteis pelo ajustamento do pH. Antes da injeção, eles devem ser convertidos à sua forma livre pelo reajustamento do pH.

Andrews et al (1964) fizeram a identificação dos ácidos pelos seus tempos de retenção e a quantificação foi feita por padronização interna.

Vieira & Souza (1985), prepararam a amostra, primeiramente, acidificando-a com ácido sulfúrico até pH=2 e depois, submetendo-a à centrifugação e filtração. A quantificação foi feita por padronização interna, usando-se o ácido crotônico como padrão.

Thornhill & Coogan (1984) prepararam as amostras para a análise de ácidos fazendo uma centrifugação por 10min a 5000g (aceleração da gravidade) ou uma filtração em membranas de filtro 0,45µm. A identificação dos compostos foi feita pelos tempos de retenção e na quantificação utilizou-se o método de padronização interna com o ácido crotônico como padrão interno.

Unger et al (1977), fizeram a preparação injetando inicialmente 1ml de ácido metafosfórico a 25% em porções de amostras de 5ml, fazendo-se posteriormente a centrifugação por 10 min a 7000 rpm. Da amostra centrifugada tomava-se 0,5µl para injeção na coluna. A identificação dos ácidos foi feita pelos tempos de retenção e a quantificação foi feita pelo método absoluto de padronização interna.

Westermann et al (1989) fizeram a preparação das amostras, acidificando-as até pH abaixo de 2,0 com ácido fosfórico e em seguida centrifugando-as.

Dinopoulou et al (1988) prepararam as amostras de ácidos voláteis fazendo a filtração em membranas de filtro Whatmann GF/C com posterior acidificação até pH 2,0 com ácido fosfórico ou ácido fórmico.

3.4.2 - Metodologias para determinação da composição dos gases da biodigestão por cromatografia a gás

Segundo Vieira & Souza (1985), o volume de biogás e sua composição são parâmetros muito eficientes no controle do processo de digestão anaeróbia. Estes autores afirmaram que quando ocorre um desbalanceamento do processo, o primeiro sinal é a redução na quantidade de gases e/ou

alteração na sua composição, o que acontece antes mesmo da elevação na concentração de ácidos voláteis.

Além disso, a determinação da composição do biogás pode ser útil nas pesquisas relacionadas com a determinação do potencial de biodegradabilidade anaeróbia de certos produtos químicos. Shelton & Tiedje (1984) necessitaram medir as quantidades de metano para essa finalidade.

Em todas as técnicas de avaliação da atividade metanogênica em que o biogás fica confinado no espaço livre dos frascos-reatores, há necessidade de se determinar a sua composição para as medidas de metano produzido. Nas metodologias propostas por Dolfing & Bloemen (1985) e por Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) para medir a atividade metanogênica específica, a determinação dessa composição era de fundamental importância.

Como na análise de ácidos voláteis, a técnica de análise mais utilizada na determinação da composição do biogás é também a cromatografia a gás (como observado Tabela 18).

A definição da metodologia geral dessa técnica de análise envolve principalmente, a coleta e a fixação dos parâmetros cromatográficos relacionados com a separação, identificação e quantificação dos gases.

Figura 21 - Cromatograma com a separação dos gases da biodigestão obtido por Vieira & Souza (1985).

Para análise são necessárias duas colunas, pois sendo o detector normalmente o de condutividade térmica, o seu princípio de funcionamento exige uma coluna de referência por onde deve passar somente o gás de arraste puro. Normalmente, com uma das colunas analisa-se a porcentagem em (nitrogênio + oxigênio), metano, dióxido de carbono e gás sulfídrico e com a outra a proporção em nitrogênio e oxigênio, separadamente.

A Tabela 18 apresenta alguns valores das condições cromatográficas retirados da literatura de tratamento de resíduos por processos de digestão anaeróbia.

A análise destes dados mostra que:

- . todos os autores utilizaram-se de colunas empacotadas e detectores de condutividade térmica;
- . O gás de arraste mais empregado foi o hélio;
- . As colunas empacotas foram normalmente as do tipo peneira molecular 5A e porapak Q.

Estas observações mostraram que, em se tratando de análise de amostras com poucos compostos, as colunas empacotadas são suficientes para uma boa resolução.

Quanto ao detector, o DCT é o único adequado, visto ser ele universal. O DIC poderia ser usado, mas para analisar apenas o metano.

O hélio é o gás de arraste mais eficiente, entretanto, no Brasil seu custo é muito elevado. Aqui, observadas as condições de segurança, o hidrogênio seria o gás de arraste mais recomendado (Ciola, 1985).

Os trabalhos de Vieira & Souza (1985) e Unger et al (1977), apresentaram cromatogramas típicos (Figuras 21 e 22) com as condições cromatográficas mostradas na Tabela 18.

Normalmente não há necessidade de preparação da amostra para injeção a não ser quando se quer eliminar o gás sulfídrico, para evitar a corrosão dos filamentos do DCT. Neste caso, faz-se passar a amostra por uma solução de acetato de zinco para reter esse gás (Ciola 1985).

Os trabalhos listados não mencionaram qualquer informação a respeito dos métodos de identificação e quantificação dos gases. Entretanto, presume-se que a identificação tenha sido feita pelos tempos de retenção e a quantificação pelo método relativo, usando-se a resposta térmica relativa (RTR) para se obter a composição percentual pela expressão (14) em 4.4.1.

Figura 22 - Cromatogramas de biogás obtido por Únger et al (1977).

Tabela 17 - Condições para análise de ácidos voláteis por cromatografia a gás

Autores	Tipo de coluna	Natureza do suporte e da fase estacionária	Dimensões da coluna	Tipo de Detector	Temperaturas (°C)	Natureza do gás de arraste	Vazão do gás de arraste (ml/min)	Vazão dos gases da chama (ml/min)	Volume de Injeção (ml)
Andrews, Thomas e Pearson (1964)	Aço -inox Empacotado	18% de carbowax 20M+2% de H ₃ PO ₄	Comp.: 10 pés Diâm.: 1/8"	DIC	Coluna: 130-180 Detector: - Injetor: 200	N ₂	12 a 22	Ar: 300 H ₂ : 20-25	5
Vieira e Souza (1985)	Chromossorb 102 Empacotada	-	Comp.: 1,8m Diâm.: 1,8"	DIC	Coluna: 190 Detector: 200 Injetor: 220	N ₂	30	Ar: 210 H ₂ : 30	-
Steverink (1984)	Vidro Chromossorb Empacotada	10% de carbowax	Comp.: 1,8m Diâm.: 4mm	DIC	Coluna: inic.: 85 fin.: 195 prog.: 6°C/min Detector: 250 Injetor: 195	He	60	-	2
de Zeeuw (1984)	Vidro Chromossorb 101 Empacotada	-	Comp.: 2,0 Diâm.: -	DIC	Coluna: 190 Detector: 200 Injetor: 180	N ₂	-	-	-
Hanaki, Matsuo, Nagase (1981)	Empacotada	20% carbowax + 2% de H ₃ PO ₄	-	DIC	-	N ₂	-	-	5
Westermann, Ahring e Mah (1989)	Capilar	-	Comp.: 10,0m Diâm.: 0,53mm	DIC	Coluna: 105 Detector: 180 Injetor: 180	-	-	-	0,5
de la Torre e Goma (1981)	Chromossorb W.A.W. (80-100 mesh) empacotada	5% de hallcomid M18+1% de H ₃ PO ₄	Comp.: 1,0m Diâm.: 2mm	DIC	-	-	-	-	-

Tabela 17 - Condições para análise de ácidos voláteis por cromatografia a gás (continuação)

Autores	Tipo de coluna	Natureza do suporte e da fase estacionária	Dimensões da coluna	Tipo de Detector	Temperaturas (°C)	Natureza do gás de arraste	Vazão do gás de arraste (ml/min)	Vazão dos gases da chama (ml/min)	Volume de Injeção (ml)
Dinopoulou, Rudd e Lester (1988)	colunas de vidro empacotada	0,3% de carbowax e 0,1% de H ₃ PO ₄	Comp.: 1,0m Diâm.: 2mm	DIC	Coluna: 120 Detector: - Injetor: -	N ₂	40	-	-
Bull, Sterrit e Lester (1984)	colunas de vidro Chromossorb 101 Empacotada	-	Comp.: 1,8m Diâm.: 5mm	DIC	-	-	-	-	-
Baresi, Mah, Ward e Kaplan (1978)	colunas de vidro Chromossorb 101 Empacotada	-	Comp.: 1,82m Diâm.: 6mm	DIC	Coluna: 200 Detector: 200 Injetor: 215	He	94	O ₂ : 86 H ₂ : 19	4
Wiegant & Lettinga (1985)	colunas de vidro Chromossorb 101 Empacotada	-	Comp.: 2m Diâm.: 2mm	DIC	Coluna: 190 Detector: 240 Injetor: -	N ₂ saturado com ácido fórmico	2,5 e 50	-	-
Thornhill & Cogan (1984)	colunas de vidro Chromossorb W-AW Empacotada	-	Comp.: 2m Diâm.: 2mm	DIC	Coluna: 120 Detector: 160 Injetor: 160	N ₂	20	-	0,5
Colberg & Young (1985)	coluna de vidro Chromossorb W-AW Empacotada	10% de FFAP ou 10% SP-1000 com 1% de H ₃ PO ₄	Comp.: 6 Pés Diâm.: 0,25"	DIC	Coluna: 150 Detector: 250 Injetor: 300	N ₂	80	-	1
Cecchi, Mata-Alvarez, Pavan, Sans e Merli (1991)	Wide bore Capilar	-	Comp.: 15m Diâm.: 0,53mm	DIC	Coluna: inic.: 85 fin.: 195 prog.: 6°C/min Detector: 250 Injetor: 195	N ₂	10	Ar: 420 N ₂ :33	-

Tabela 17 - Condições para análise de ácidos voláteis por cromatografia a gás (continuação)

Autores	Tipo de coluna	Natureza do suporte e da fase estacionária	Dimensões da coluna	Tipo de Detector	Temperaturas (°C)	Natureza do gás de arraste	Vazão do gás de arraste (ml/min)	Vazão dos gases da chama (ml/min)	Volume de Injeção (ml)
Visser, Gao e Lettinga (1991)	coluna de vidro Empacotada	10% de Fluorad FC 431	Comp.: 2m Diâm.: 4mm	DIC	Coluna: 130 Detector: 240 Injetor: 220	N ₂ saturado com ácido fórmico	50	—	—
Modesto Filho, Amerlynck, Nyns e Naveau (1991)	Coluna de vidro Chromossorb W-AW	91% de carbowax 20M e 9% de H ₃ PO ₄	Comp.: 2,0m Diâm.: —	DIC	—	—	—	—	—
Unger, Voznáková e Páca (1977)	coluna de vidro Chromossorb W-AW Empacotada	10% de halcomid M18 +1% de H ₃ PO ₄	Comp.: 2,4m Diâm.: 3mm	DIC	Coluna: 132 Detector: — Injetor: 170	N ₂	40	—	0,5
Field & Lettinga (1987)	coluna de vidro Empacotada	10% de Fluorad FC 431	Comp.: 2,0m Diâm.: 2mm	DIC	Coluna: 130 Detector: — Injetor: —	N ₂ saturado com ácido fórmico	35	—	—

Tabela 18 - Condições para análise de gases da biodigestão por cromatografia a gás

Autores	Tipo de coluna	Natureza do suporte e da fase estacionária	Dimensões da coluna	Tipo de Detector	Temperaturas (°C)	Natureza do gás de arraste	Vazão do gás de arraste (ml/min)	Volume de Injeção (ml)
Vieira & Souza (1985)	1. Peneira molecular 5A 2. Chromossorb 102 Empacotadas	—	1.Comp.: 1,8m Diâm.: 1,8" 2.Comp.: 1,8m Diâm.: 1/8"	DCT	Coluna: 70 Detector: 76 Injetor: 72	He	40	—
Hanaki, Matsuo, Nagase (1981)	Empacotada	carvão ativado	—	DCT	—	N ₂	—	1
Westermann, Ahring e Mah (1989)	Empacotada	carvão ativado	Comp.: 3,65m Diâm.: —	DCT	Coluna: 180 Detector: 60 Injetor: 60	—	—	—
Harvey, Fosberg, Beveridge, Pos e Ogilvie (1984)	Aço-inox Chromossorb 102 Empacotada	—	Comp.: 1,83m Diâm.: 3,2mm	DCT	—	He	60	—
Baresi, Mah, Ward e Kaplan (1978)	colunas de cobre 1.Peneira molecular 5A 2.Porapak Q Empacotadas	—	1.Comp.: 4,57m Diâm.: 2mm 2.Comp.: 12,2m Diâm.: 2mm	DCT	Coluna: 100 Detector: 100 Injetor: 100	N ₂	25	0,3
Wiegant & Lettinga (1985)	Aço-inox Porapak Q Empacotadas	—	Comp.: 2m Diâm.: 2mm	DCT	—	He	—	—

Tabela 18 - Condições para análise de gases da biodigestão por cromatografia a gás (continuação)

Autores	Tipo de coluna	Natureza do suporte e da fase estacionária	Dimensões da coluna	Tipo de Detector	Temperaturas (°C)	Natureza do gás de arraste	Vazão do gás de arraste (ml/min)	Volume de Injeção (ml)
Bhadra, Scharer e Moo-Young (1987)	Porapack Empacotadas	—	—	DCT	Coluna: 40 Detector: 100 Injetor: 100	He	30	0,1
Dolfing & Bloemen (1985)	Peneira molecular Empacotada	—	—	DCT	Coluna: 50 Detector: — Injetor: —	Argônio	20	—
Cohen (1991)	Porapack T Empacotadas	—	Comp.: 6 Pés Diâm.: 1/8"	DCT	Coluna: 60 Detector: 210 Injetor: 180	—	—	0,5
Modesto Filho, Amerlynck, Nyns Naveau (1991)	1.Peneira molecular 5A 2.Porapack Q Empacotadas	—	1.Comp.: 1,52m Diâm.: 1/8" 2.Comp.: 3,0m Diâm.: 1/8"	DCT	—	—	—	—
Unger, Voznáková e Páca (1977)	1.Peneira molecular 5A 2.Chromossorb 102 Empacotadas	—		DCT	Coluna: 35 Detector: 40 Injetor: —	He	24	—

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Considerações

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados para a realização do teste de atividade metanogênica específica e, também, para a determinação de ácidos voláteis e composição do biogás por cromatografia gasosa. São descritas ainda as diversas etapas do trabalho experimental.

Para se chegar à definição de um procedimento metodológico para tais análises, foi necessário um estudo de adaptação das técnicas cromatográficas às condições e necessidades do trabalho proposto. Nesse estudo procurou-se otimizar as análises no sentido de garantir a qualidade dos resultados e diminuir o tempo de ensaio. Esse desenvolvimento levou à definição das metodologias apresentadas a seguir.

4.2 - Materiais e métodos utilizados para o teste de atividade metanogênica específica.

4.2.1 - Considerações Preliminares

Por se tratar de um trabalho que procurou otimizar procedimentos para avaliação da atividade microbiana de um lodo anaeróbio, tomou-se como base uma metodologia já existente, aquela desenvolvida por Willem de Zeeuw (1984). Utilizou-se essa metodologia pela sua simplicidade em relação à técnica de medição do metano e, principalmente, porque dentre os autores pesquisados este foi o que mais se aprofundou no estudo da metodologia do teste de atividade. Procurou-se analisar cada passo da técnica proposta pelo

autor, e assim, modificações foram sendo introduzidas.

Dessa forma, o trabalho experimental foi realizado em etapas, a saber:

- a - testes para reprodução da técnica de de Zeeuw (1984);
- b - testes para verificação da importância e do tipo de agitação;
- c - testes para verificação da influência da quantidade de biomassa;
- d - testes para verificação da influência da natureza dos substratos;
- e - testes para verificação da influência da quantidade de substratos;
- f - testes para verificação da importância de nutrientes;
- g - testes para verificação da necessidade de remoção de oxigênio do meio por borbulhamento de nitrogênio;
- h - testes com diferentes tipos de lodos empregando-se a metodologia desenvolvida no presente trabalho;
- i - testes comparativos entre as técnicas propostas; para isso empregaram-se aquelas propostas por de Zeeuw (1984), Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) e pelo presente trabalho;
- j - testes utilizando as próprias águas residuárias como substratos;
- k - testes para estudar a influência do armazenamento do lodo nas medidas de atividade

Para cumprir cada uma destas etapas as técnicas e condições dos ensaios foram sendo modificadas. Entretanto, boa parte dos materiais e condições de ensaio básicos foram mantidos. Eles serão apresentados a seguir, separadamente, para os ensaios baseados na técnica de Willem de Zeeuw (1984) e para os ensaios com a técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989). Foram estudados 5 (cinco) tipos de lodos compreendendo lodo de digestor de esgoto doméstico e

lodos de reatores de fluxo ascendente e manta de lodo utilizados para o tratamento de águas residuárias de indústrias de conservas alimentícias, de açúcar, de álcool e de cerveja e refrigerantes. Foram realizados também quatro testes com lodo de reator de fluxo ascendente e manta de lodo de bancada de laboratório (10 ℓ). Os testes foram executados em duplicata e alguns em triplicata. Os resultados foram analisados segundo critérios relacionados com o valor da atividade metanogênica, o tempo de ensaio e a simplicidade da metodologia adotada.

4.2.2 - Materiais e Condições de Ensaio

a - para os ensaios baseados na técnica de de Zeeuw(1984).

- Estufa incubadora, marca FANEM, modelo 347F, para controle da temperatura dos conjuntos reator-gasômetro. Temperatura ajustável de 0°C a 60°C;
- Frascos-reatores de volume total igual a 680 ml aproximadamente e volume útil igual a 650 ml;
- Agitadores magnéticos para agitação contínua do meio contido nos reatores;
- Gasômetros tipo frasco de Mariotte para medida da produção do metano por sistema de deslocamento de líquido;
- Provetas de 50 e 100ml para coleta e medida dos volumes de líquido deslocados;
- Solução de nutrientes:

Composto	Concentração (mg/l)
$(\text{NH}_4)_2.\text{SO}_4$	13,6
$\text{NH}_4.\text{Cl}$	73,6
KH_2PO_4	13,6

- Solução traço de Metais, segundo Zehnder, 1976 apud de Zeeuw (1984):

Composto	Concentração (mg/l)
H_3PO_3 (sol. saturada)	1ml (em volume)

Fe.Cl ₂ .4H ₂ O	:	2000
Zn.Cl ₂	:	50
Mn.Cl ₂ .4H ₂ O	:	500
Cu.Cl ₂ .2H ₂ O	:	30
(NH ₄) ₆ .Mo ₇ .O ₂₄ .4H ₂ O	:	50
AlCl ₃	:	50
CoCl ₃ .6H ₂ O	:	2000
HCl (Concentrado)	:	1 ml (em volume)

Concentração da solução traço de metais: 1 ml/l

- Solução de resazurina a 0,1% : 1 ml/l
- Substratos utilizados:

Acetato, propionato e buritato, separadamente e em conjunto. Foi testado também o formiato.

Concentração dos substratos, conforme de Zeeuw (1984), quando da reprodução de sua metodologia. Durante este estudo, foram pesquisadas concentrações adequadas para cada lodo testado.
- Concentração de SSV do lodo nos testes: conforme de Zeeuw(1984), quando da reprodução de sua metodologia, e, igual a 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g/l nos testes com lodo de digestor de esgoto, e, 10 g/l nos testes com os demais lodos, durante o presente trabalho.
- Temperatura do ensaio: 30°C nos testes com os lodos de esgoto doméstico e das indústrias de conservas alimentícias, de açúcar e cerveja.
56°C nos testes com o lodo da indústria de álcool;
- Sistema de remoção de dióxido de carbono do biogás para medida de metano: borbulhamento no líquido do gasômetro (solução 2% de soda - peso/volume)
- Agitação:

contínua - com auxílio de agitadores magnéticos

intermitente - manualmente antes de cada leitura de metano.
- pH de início do teste: 7,0

- Remoção de oxigênio do meio: fluxionamento de nitrogênio 100% puro por 5 min (borbulhamento no meio)
- Água de diluição: água destilada desoxigenada para os testes do 1º bloco de ensaios e água destilada sem desoxigenar nos demais testes.
- Armazenamento do lodo: em geladeira a 4°C
- Aclimação do lodo antes do teste: lodo em quantidade para o teste mais água de diluição, distribuído nos reatores e deixado na estufa (30°C) por aproximadamente 15 horas.
- Amostras de lodo: foram pesquisados os 05 (cinco) tipos de lodos mencionados em 4.2.1 e que estão caracterizados em 5.2.5.
- Determinação de ácidos voláteis e composição do biogás: conforme exposto em 4.3 e 4.4

A figura 23 representa esquematicamente a montagem para os ensaios. Foram montados 12 conjuntos iguais aos da figura, dentro da estufa.

Figura 23 - Conjunto reator-gasômetro-recipiente coletor empregado nos testes de atividade

As Fotografias 01 e 02 mostram a estufa com os

conjuntos durante a realização de um ensaio.

Fotografia 1

Fotografia 2

As fotos mostram a estufa e a montagem para os ensaios, durante a realização de um teste

b - Para reprodução da técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989)

- Sistema de banho-maria para controle da temperatura dos frascos-reatores.
- Frascos-reatores de volume total igual a 650ml aproximadamente.
- Temperatura do teste : 37°C
- Concentração de SSV para o teste : a mesma da

amostra de lodo

- Quantidade de lodo para o teste : 100g
- Concentração dos substratos utilizados individualmente
 - . acetato : 1000mg/l
 - . propionato : 1000mg/l
 - . butirato : 1000mg/l

Os volumes de metano produzidos foram medidos com o auxílio de cromatografia gasosa, utilizando-se os seguintes equipamentos e condições cromatográficas:

- Cromatógrafo Gow Mac com detector de condutividade térmica.
- Colunas:
 - Peneira molecular 5A
 - comprimento: 1,80m
 - diâmetro interno: 1/8"
 - Porapak Q
 - comprimento: 2,50m
 - diâmetro interno: 3/16"
- Gás de arraste: Hidrogênio super seco
- vazão do gás de arraste: 65 ml/min.
- Temperaturas: detector: 65°C
 - colunas: 65°C
- Volume de injeção: 0,40 ml nos testes com os lodos das indústrias de açúcar, de álcool e de cerveja e 0,50 ml nos testes com os lodos de esgoto doméstico e da indústria de conservas alimentícias.

4.2.3-Procedimentos para realização do teste

a - Com base na técnica de de Zeeuw (1984):

- . determinava-se a concentração de sólidos suspensos voláteis(SSV) de cada uma das amostras de lodo submetidas ao teste;
- . colocava-se em cada frasco-reator os volumes

necessários para se obter a concentração de SSV definida para o início do teste;

- completavam-se os frascos-reactores com água destilada até 600 ml;
- deixavam-se os frascos-reactores na estufa por 15 horas aproximadamente, à 30°C;
- adicionavam-se as soluções de minerais, de metais e de resazurina nas concentrações definidas para o teste;
- ajustava-se o pH para 7,0 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico
- adicionavam-se os substratos nas concentrações definidas para o teste;
- borbulhava-se nitrogênio 100% puro por 5 min no meio;
- fechavam-se os frascos, sendo então incubados à 30°C;
- deixava-se fechada a passagem de biogás do reator ao gasômetro durante 30 minutos. Em seguida, abria-se e descartava-se o primeiro volume de líquido deslocado;
- iniciavam-se então, as leituras de metano a cada 30 minutos, durante aproximadamente 3(três) horas. Após o que, as leituras passavam a ser feitas normalmente em intervalos de 1(uma) hora podendo ocorrer intervalos inferiores ou superiores a este valor em função de maiores ou menores taxas de produção de metano, respectivamente;
- ao final do teste determinava-se a concentração de SSV em cada frasco-reator. Com esse valor e aquele do início do teste determinava-se a concentração média de SSV, a ser utilizada no cálculo da atividade metonogênica específica .

b - Com base na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller(1989):

- . determinava-se os volumes internos de cada frasco-reator através das diferenças entre seus pesos quando cheios de água e de seus pesos quando vazios.
- . colocava-se em cada frasco-reator 100 gramas de cada uma das amostras de lodo submetidas ao teste;
- . deixavam-se os frascos-reactores na estufa por 15 horas aproximadamente , à 37°C
- . adicionava-se separadamente em cada frasco, 0,1ml dos ácidos acéticos, propiônico e butírico, neutralizados com hidróxido de sódio , deixando-se para cada ensaio; um frasco-reator sem qualquer substrato, utilizado como "branco";
- . fluxionava-se nitrogênio 100% puro por 5 minutos no espaço livre do frasco-reator. Este gás era também usado para calcular as perdas de metano que ocorriam em consequência das coletas sucessivas para análise cromatográfica;
- . fechavam-se os frascos e levava-os para o banho-maria (37°C);
- . iniciava-se então o monitoramento da produção de metano. De hora em hora , agitava-se cada frasco-reator e coletava-se 0,40 ml ou 0,50 ml de biogás que era injetado no cromatógrafo para a análise de sua composição. Com o resultado da composição percentual e o auxílio de uma curva padrão determinava-se o volume de metano de cada coleta;
- . ao final do teste , determinava-se a concentração de SSV em cada frasco-reator. Esse resultado era utilizado no cálculo da atividade metanogênica específica.

4.3 - Análises de ácidos voláteis por cromatografia gasosa

Na revisão da literatura apresentada no item 3.4 observa-se, através da descrição das metodologias de determinação de ácidos voláteis, uma utilização preferencial de colunas do tipo empacotadas, como as chromossorb. Como as colunas empacotadas são menos eficientes na separação dos compostos de uma amostra, do que as colunas capilares, a coluna definida para essa pesquisa foi uma coluna semi-capilar, conhecida como megabore, especialmente desenvolvida para essa análise pela L&M Alta Tecnologia para Sistemas Analíticos, situada na cidade de São Carlos - SP - Brasil.

Os equipamentos e condições para a análise cromatográfica foram os seguintes:

- Cromatógrafo CG3537, com detector de ionização de chama (DIC);
- registrador integrador CG300;
- programador linear de temperatura PLT-CG;
- coluna semi-capilar (megabore)
 - . fase LM - 100
 - . comprimento: 15 m
 - . diâmetro interno: 0,53 mm
 - . temperatura máxima recomendada : 250°C
- Temperaturas
 - . injetor: 250°C
 - . detector: 300°C
- Vazão dos gases da chama
 - . Hidrogênio : 30ml/min
 - . Ar : 240ml/min

Após os estudos de otimização da temperatura da coluna, de vazão do gás de arraste e testados alguns volumes de injeção, estas condições de análise ficaram assim definidas:

- Temperaturas
 - . coluna: inicial - 80°C
 - final - 200°C
 - . Programação de temperatura: 10°C/min
- Vazão dos gases de arraste
 - . Nitrogênio: 2,65ml/min
- Volume de injeção: 1µl

4.3.1 - Identificação e quantificação dos ácidos no cromatograma.

A identificação de cada ácido no cromatograma foi feita utilizando-se o método de contaminação de uma amostra padrão com cada ácido separadamente.

A quantificação foi feita pelo método absoluto de análise por padronização interna, utilizando-se o ácido crotônico como padrão interno.

Através destes métodos chegou-se à identificação de cada ácido, conforme a sequência de eluição mostrada no cromatograma 01. Quanto à quantificação, ela foi feita com a obtenção das curvas de calibração, concentração do ácido em função da relação área do pico do ácido pela área do pico do padrão interno no cromatograma, para uma faixa de concentração pré-determinada. Estas curvas de calibração geraram equações do tipo da expressão (13) e possibilitaram calcular as concentrações de cada ácido da amostra em função do cromatograma obtido.

$$C_i = \frac{1}{a} \left(\frac{A_i}{A_p} - b \right) \dots\dots\dots (13)$$

em que,

Ai: área do pico de cada ácido no cromatograma
 Ap: área do pico do padrão interno no cromatograma
 Ci: concentração de cada ácido
 a e b: parâmetros da curva

O padrão interno utilizado foi o ácido crotônico, conforme recomendado por Andrews et al (1964).

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.757	29			0.0918	
2	0.865	15	V		0.0477	
3	0.925	176	V		0.5595	
4	1.048	36	V		0.114	
5	3.753	2098			6.6721	Acét.
6	4.628	3580			11.3837	Prop.
7	4.917	6222	V		19.7883	But.
8	5.59	5357	V		17.0361	Isobut.
9	6.027	6775	V		21.5446	Isoval.
10	6.772	5856	V		18.6235	Val.
11	7.197	1301	V		4.1386	Crot.
TOTAL		31445			100	

Cromatograma 01 - Identificação dos ácidos voláteis no cromatograma, através da sequência de eluição.

4.3.2 - Procedimentos para a análise cromatográfica dos ácidos voláteis.

- a) Coletava-se 5 ml de amostra diretamente do frasco-reator (ponto 4 da figura 23), com auxílio de uma seringa.
- b) Media-se o pH da amostra coletada e posteriormente promovia-se o abaixamento para pH = 2,0 com ácido sulfúrico concentrado ;
- c) Centrifugava-se a amostra por 15 min a 7200 rpm;
- d) Coletava-se 2,0 ml de amostra centrifugada para ser preparada para a análise cromatográfica;
- e) Adicionava-se 0,2 ml do padrão interno (ácido crotônico) de uma solução estoque com concentração igual a 2500 mg/l. Ou seja, a concentração de ácido crotônico na amostra era sempre igual à sua concentração nas amostras-padrão utilizadas nas calibrações;
- f) injetava-se no cromatógrafo 1µl de amostra assim preparada, com auxílio de uma seringa de 1µl (marca Hamilton);
- g) Obtinha-se o cromatograma, identificavam-se os ácidos e calculavam-se as suas concentrações através das equações determinadas pelas calibrações.

Obs.: No cálculo da concentração de cada ácido, os valores obtidos com as equações eram multiplicados por um fator de diluição. Esse fator corrigia o

efeito de diluição da amostra original, devido à adição dos volumes de padrão interno (ácido crotônico).

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{Volume da amostra} + \text{volume do padrão}}{\text{Volume da amostra}}$$

de e), obtém-se:

$$\text{Fator de diluição} = \frac{2,0 + 0,2}{2,0} = 1,10$$

4.4 - Análises de composição do biogás por cromatografia gasosa.

Foram estes os equipamentos e as condições definidos para as análises do biogás:

a - Equipamentos

- Cromatógrafo CG3537, com detector de condutividade térmica;
- registrador integrador CG300;
- colunas

1. Peneira molecular 5A

- . comprimento: 1,80 m
- . diâmetro interno: 1/8"
- . temperatura máxima: 250°C

2. Porapak Q

- . comprimento: 2,50m
- . diâmetro interno: 3/16"
- . temperatura máxima: 250°C

- gás de arraste: hidrogênio super seco

b - Condições de Análise

- detector: 164°C
- temperaturas: colunas : 63°C
- injetor : 118°C
- Vazão do gás de arraste: 30ml/min
- Volume de injeção: 0,25 ml

4.4.1 - Identificação e Determinação da Composição Percentual do Biogás.

A coluna Porapack Q foi utilizada na separação dos seguintes gases da amostra:

- . dióxido de carbono (CO_2);
- . gás sulfídrico (H_2S);
- . Ar: Nitrogênio + Oxigênio ($\text{N}_2 + \text{O}_2$).

A coluna peneira molecular 5A, fazia a separação do nitrogênio (N_2) e do oxigênio (O_2) da amostra.

O H_2S não era analisado.

A identificação dos gases foi feita pelo método de comparação com os tempos de retenção de gases padrões.

O cromatograma 02 ilustra essa identificação.

Cromatograma 02: Sequência de eluição do biogás na coluna Porapack Q

A determinação da composição percentual do biogás foi feita pelo método relativo de resposta térmica relativa.

Para os cálculos utilizou-se a expressão (14)

juntamente com os valores da resposta térmica relativa (RTR) apresentados na Tabela 19.

$$\%G_i = \frac{\frac{A_i}{RTR_i}}{\sum \frac{A_i}{RTR_i}} \times 100 \quad (14)$$

Tabela 19 - Valores da resposta térmica relativa (RTR) para alguns gases

Gás	RTR
Ar	41
CH ₄	36
CO ₂	48
H ₂ S	45
N ₂	42
O ₂	40

Fonte: CIOLA (1985)

A Tabela 20 e o cromatograma 03 mostram um exemplo ilustrativo dos cálculos das porcentagens de cada gás da biodigestão.

Tabela 20 - Cálculo das porcentagens reais de gases da biodigestão referentes ao cromatograma 03

Gás	Tempo de retenção (min)	Área relativa	% relativa	$\%real = \frac{\frac{A_i}{RTR_i}}{\sum \frac{A_i}{RTR_i}} \times 100$
Ar	0,557	63583	39,722	37,12
CH ₄	0,797	88890	55,532	59,10
CO ₂	1,382	7598	4,746	6,02

Cromatograma 03 - Análise de biogás utilizada nos cálculos da tabela 20

4.4.2 - Procedimentos para as análises cromatográficas do biogás.

- retirava-se 0,25ml de biogás do frasco-reator (ponto 5 da Figura 23), com auxílio de uma seringa;
- injetava-se essa amostra no cromatógrafo;
- obtinha-se o cromatograma, identificavam-se os gases pelos tempos de eluição (sempre na ordem: ar, metano e dióxido de carbono) e calculavam-se suas composições percentuais a partir das áreas dos picos fornecidas pelo cromatograma.

Estas áreas eram corrigidas pela RTR de cada gás para se obter a porcentagem real.

Obs.: Estes procedimentos eram utilizados para a

determinação da composição percentual do biogás nos testes com a técnica de de Zeeuw (1984).

Na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) a análise do biogás foi empregada para se medir a produção de metano. Neste caso os volumes injetados foram aqueles citados em 4.2.2 item (b).

4.5 - Determinação da Concentração de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) do lodo.

4.5.1 - Considerações

A metodologia padronizada para a determinação da concentração de SSV é a definida pelo "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (1975).

Nessa metodologia utilizam-se membranas filtrantes de 0,45µm para separar os sólidos suspensos da porção de matéria dissolvida.

Como os lodos eram muito concentrados (concentração de sólidos totais superiores a 100g/l), não se conseguia filtrar uma amostra significativa de lodo, o que acabava introduzindo erros grosseiros nas medidas de concentração de SSV.

Adotou-se então a metodologia proposta por PEREIRA et al (1986), que separa os sólidos dissolvidos dos suspensos por centrifugação.

4.5.2 - Procedimento para determinação da concentração de SSV.

Essa metodologia, adaptada às condições desse trabalho levou aos seguintes procedimentos:

- tomavam-se 20ml de amostra de lodo com uma pipeta volumétrica;
- centrifugava-se a amostra por 20 min em 4.000rpm;
- descartava-se a porção sobrenadante da amostra

centrifugada;

- retirava-se a porção sedimentada e secava-se a 103°C por 12 horas;
- pesava-se a amostra seca (P_1);
- calcinava-se essa amostra a 600°C por 2 horas;
- pesava-se a amostra calcinada (P_2);
- calculava-se a concentração de SSV por:

$$SSV(g/l) = \frac{P_1(g) - P_2(g)}{0,020(l)}$$

4.6 - Determinação dos volumes de metano

a) Para os testes com a técnica de de Zeeuw (1984)

Os volumes de metano eram medidos por sistemas de deslocamento de líquido, utilizando-se gasômetros do tipo frasco de Mariotte como mostrado na Figura 23.

Nas medidas feitas por de Zeeuw (1984), o dióxido de carbono (CO_2) era removido, fazendo-se o biogás atravessar inicialmente um filtro constituído de grânulos de hidróxido de sódio (NaOH) e, posteriormente, uma solução desse composto com concentração de 1% (peso/volume), como mostra a Figura 07, em 3.2.6.2.

Nas medidas realizadas nesse trabalho, tentou-se inicialmente usar essa mesma técnica para retenção do dióxido de carbono. Entretanto, teve-se que eliminar o filtro de soda, pois sendo, este material muito higroscópico, os grânulos acabavam se dissolvendo com a umidade do gás. Dessa forma, o dióxido de carbono foi removido fazendo-se apenas o borbulhamento do biogás na solução de NaOH a 2% (peso/volume).

b) Para os testes com a técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989).

Os volumes de metano produzidos eram medidos com a mesma técnica descrita em 3.2.6.5, utilizando-se dos equipamentos e condições apresentados em 4.2.2 item b. Obteve-se uma curva padrão que relacionava os volumes de metano às áreas fornecidas pelos cromatogramas, para auxiliar no cálculo dos volumes de metano medidos por essa técnica.

4.6.1 - Procedimentos empregados para cálculo da atividade metanogênica específica e da fase "lag".

a) Cálculo aplicado aos testes baseados na técnica de Zeeuw (1984):

- a partir dos volumes de metano medidos em cada intervalo de tempo, transformava-se estes valores em quantidades equivalentes de DQO consumida, através da seguinte relação estequiométrica
 $1 \text{ gDQO}_{\text{consumida}} = 350 \text{ ml de CH}_4 \text{ na CNTP (Speece, 1983):}$

Tomando-se a pressão atmosférica média de São Carlos, em torno de 700 mm Hg, obteve-se as seguintes relações:

para 30°C : $1 \text{ gDQO}_{\text{cons.}} = 422 \text{ ml de CH}_4$

para 37°C : $1 \text{ gDQO}_{\text{cons.}} = 431 \text{ ml de CH}_4$

para 56°C : $1 \text{ gDQO}_{\text{cons.}} = 458 \text{ ml de CH}_4$

- dividia-se cada valor de DQO consumida em grama pela quantidade de biomassa do teste (média dos valores SSV no início e fim do teste em grama);
- traçava-se a curva de atividade metanogênica específica com estes valores acumulados em ordenada e os respectivos intervalos de tempo, expressos em dia, em abcissa.
 Esta curvas estão ilustradas nas Figuras 24.a e 24.b
- escolhia-se o 1º trecho retilíneo de inclinação máxima da curva, que deveria conter no mínimo 4 (quatro) pontos;
- ajustavam-se os pontos desse trecho por uma regressão linear, determinando-se a equação da reta;
- o coeficiente angular dessa reta expressava o valor da atividade metanogênica específica;
- determinava-se o período de tempo consumido desde a começo do teste até o início do trecho onde as

ponto da regressão linear);

- calculava-se o tempo que seria consumido do início do teste até esse ponto se as taxas de produção de metano fossem as máximas determinadas;
- as diferenças entre estes dois períodos de tempo representava o valor da fase "lag".

Figura 24.a

Figura 24.b

Curvas típicas do teste de atividade metanogênica específica

- Exemplos ilustrativos

- 1º exemplo

1) Caracterização do teste

- . volume útil do frasco-reator: 0,650 l
- . Concentração de SSV da amostra de lodo: 25,16g/l
- . Concentração de SSV no início do teste: 2,5 g/l
- . Concentração de SSV no fim do teste: 2,44g/l
- acetato: 600mg/l
- . Substrato propionato: 600mg/l
- butirato: 600mg/l
- . DQO teórica do substrato: 2640mg/l

YES!!

2) Cálculo da atividade metanogênica específica

- . Concentração de SSV usada no cálculo : $\frac{2,50 + 2,44}{2} = 2,47 \text{ g/l};$
- . Quantidade de SSV usada no cálculo: $2,47 \times 0,65 = 1,61 \text{ g};$
- . Pontos utilizados na regressão linear: do 27º ao 33º;
- . Valor da atividade calculado pela regressão linear : $0,247 \text{ g}(\text{CH}_4 - \text{DQO}). \text{gSSV}^{-1}. \text{dia}^{-1}$
- . valor da fase "lag": 0,668 dias

- 2º Exemplo

1) Caracterização do teste

- . volume útil do frasco-reator: 0,65 l
- . Concentração de SSV da amostra de lodo: 43,90g/l
- . Concentração de SSV no início do teste: 10,00g/l
- . Concentração de SSV no fim do teste: 9,97 g/l
- acetato: 1400 mg/l
- propionato: 1400 mg/l
- butirato: 1400 mg/l
- . DQO teórica do substrato: 6160 mg/l

2) Cálculo da atividade metanogênica específica

- . Concentração de SSV usada no cálculo: $\frac{10,0 + 9,97}{2} = 9,99 \text{ g/l};$
- . Quantidade de SSV usada no cálculo: $9,99 \times 0,65 = 6,49 \text{ g};$
- . Pontos utilizados na regressão linear: do 7º ao 10º;
- . Valor da atividade calculado pela regressão linear: $0,369 \text{ g}(\text{CH}_4 - \text{DQO}). \text{gSSV}^{-1}. \text{dia}^{-1}$
- . valor da fase "lag": 0,145 dias

As Tabelas 21 e 22 mostram os resultados das medidas das taxas de metano dos dois exemplos ilustrados e a sequência de cálculos que levou à obtenção das curvas das

Figuras 25 e 26.

Tabela 21 - Resultados referentes ao 1º exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de de Zeeuw (1984)

Dias	Metano Acumulado (ml)	gDQO _{cons} / gSSV Acumulado	Dias	Metano Acumulado (ml)	gDQO _{cons} / gSSV Acumulado
0,000	0,0	0,0000	1,395	140,5	0,2066
0,021	0,0	0,0000	1,475	152,5	0,2243
0,042	0,0	0,0000	1,871	201,5	0,2964
0,083	1,5	0,0022	1,954	214,0	0,3147
0,125	3,5	0,0051	2,037	227,5	0,3346
0,170	6,0	0,0088	2,210	243,0	0,3574
0,208	8,0	0,0117	2,203	257,0	0,3780
0,250	10,5	0,0154	2,286	270,0	0,3971
0,295	14,5	0,0213	2,369	238,5	0,4169 ⁱ
0,337	17,5	0,0257	2,480	303,5	0,4464
0,382	21,0	0,0309	2,911	347,5	0,5111
0,445	28,0	0,0412	3,036	365,5	0,5390
0,522	37,0	0,0544	3,161	385,5	0,5669
0,876	73,0	0,1074	3,349	401,5	0,5905
0,918	77,0	0,1132	3,453	412,0	0,6059
0,963	81,5	0,1198	3,880	434,5	0,6390
1,005	86,5	0,1272	3,932	440,5	0,6478
1,078	97,5	0,1434	4,015	447,5	0,6582
1,120	102,5	0,1507	4,098	454,4	0,6684
1,169	109,5	0,1611	4,202	460,5	0,6773
1,211	116,5	0,1713	4,306	468,5	0,6890
1,253	121,5	0,1787	4,431	437,5	0,6964
1,295	126,5	0,1860	4,667	481,5	0,7082

Figura 25 - Curva referente ao 1º exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de de Zeeuw (1984)

Tabela 22 - Resultados referentes ao 2º exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de de Zeeuw (1984).

Dias	Metano Acumulado (ml)	$\text{gDQO}_{\text{cons}}/\text{gSSV}$ Acumulado
0,000	0,0	0,0000
0,031	1,0	0,0003
0,080	3,0	0,0011
0,125	20,0	0,0079
0,167	52,5	0,0186
0,230	117,5	0,0416
0,293	184,5	0,0652
0,356	255,0	0,0902
0,408	327,5	0,1158
0,471	410,5	0,1451
0,534	483,0	0,1707
0,930	670,5	0,2370
0,972	706,5	0,2497
1,024	750,5	0,22654
1,087	806,5	0,2851
1,146	850,5	0,3007
1,216	887,5	0,3138

Figura 26 - Curva referente ao 2º exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de de Zeeuw (1984)

- b) Cálculo aplicado aos testes baseados na técnica de Dubourguier (1989) apud Vazoller(1989)

Para determinação dos volumes de metano produzidos foi adotado o procedimento descrito em 3.2.6.5, utilizando-se da curva padrão de metano apresentada em 5.2.4. A partir da obtenção destes valores, os procedimentos para cálculo da atividade metanogênica foram os mesmos aplicados à técnica de de Zeeuw (1984), descritos no item e) de 4.4.4.

Exemplo ilustrativo

1) Caracterização do teste

. Volume total dos frascos-reatores	{	para o teste com substrato: 580,1ml
	{	para o teste "branco" : 631,4 ml
. Volume do espaço livre dos frascos-reatores	{	com lodo e substrato : 445,1ml
	{	com lodo apenas ("branco") : 531,4ml
. Concentração de SSV no início do teste	{	teste com substrato : 43,30g/l
	{	teste "branco" : 43,30g/l
. Volume de lodo no início do teste		: 100ml
. Massa de SSV no início do teste	{	teste com substrato : 4,33g
	{	teste "branco" : 4,33g
. Concentração de SSV no fim do teste	{	teste com substrato : 43,56g/l
	{	teste "branco" : 43,12g/l
. Massa de SSV no fim do teste	{	teste com substrato : 4,36 g
	{	teste "branco" : 4,31 g
. Concentração de substrato - acetato		: 1 g/l
. Volume de substrato		: 35 ml

- . DQO teórica do substrato : 1010mg/l
- . Volume de biogás injetado : 0,50 ml
nas análises cromatográficas
- . Equação da curva : $CH_4 = 1,085 \times 10^{-5} \cdot A_{CH_4} + 0,00018ml$
padrão de metano

2) Cálculo da atividade metanogênica específica

- . Massa de SSV usada no cálculo

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{teste com substrato} : \frac{4,33 + 4,36}{2} = 4,35g \\ \text{teste "branco"} : \frac{4,33 + 4,31}{2} = 4,32g \end{array} \right.$$
- . Pontos utilizados na regressão linear

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{teste com substrato} : 9^\circ \text{ ao } 13^\circ \\ \text{teste "branco"} : 4^\circ \text{ ao } 7^\circ \end{array} \right.$$
- . Valor da atividade metanogênica

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{teste com substrato} : & 0,170g(CH_4 - DQO) \cdot gSSV^{-1} \cdot dia^{-1} \\ \text{teste "branco"} : & 0,039g(CH_4 - DQO) \cdot gSSV^{-1} \cdot dia^{-1} \end{array} \right.$$
- . Valor da atividade metanogênica real : $0,131g(CH_4 - DQO) \cdot gSSV^{-1} \cdot dia^{-1}$
- . Valor da fase "lag"

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{teste com substrato} : 0,132 \text{ dias} \\ \text{teste "branco"} : 0,116 \text{ dias} \end{array} \right.$$

A tabela 23 mostra os resultados das taxas de metano do exemplo ilustrativo e a sequência de cálculo que levou à obtenção da curva da figura 27.

Tabela 23 - Resultados referentes ao exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989).

Teste "branco"					Teste com substrato				
Dias	Área de metano no cromatograma	Área de metano corrigida	Metano Acumulado (ml)	gDQO _{cons} /gSSV Acumulado	Dias	Área de metano no cromatograma	Área de metano corrigida	Metano Acumulado (ml)	gDQO _{cons} /gSSV Acumulado
0,000	0,0	0,0	0,0	0,0000	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0000
0,049	25	24	0,6	0,0003	0,014	0,0	0,0	0,0	0,0000
0,084	89	89	1,5	0,008	0,024	36	34	0,6	0,0003
0,191	363	367	5,5	0,0027	0,034	46	45	0,7	0,0004
0,226	563	560	8,3	0,0042	0,045	60	56	0,9	0,0005
0,282	810	822	12,1	0,0061	0,055	86	82	1,2	0,0006
0,317	1021	101	14,8	0,0075	0,079	112	107	1,5	0,0008
0,3359	1101	1144	16,7	0,0084	0,172	1141	1151	14,1	0,0071
					0,193	1609	1638	20,0	0,0101
					0,203	1962	1968	24,0	0,0121
					0,220	2338	2387	29,0	0,0146
					0,224	2891	3016	36,6	0,0184
					0,265	3398	3589	43,5	0,0218
					0,289	3812	4059	49,2	0,0247
					0,306	4032	4359	52,8	0,0265
					0,0327	4216	4629	56,1	0,0282
					0,348	4361	4816	58,3	0,0293

Figura 27 - Curva referente ao exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) para o teste "branco".

Figura 28 - Curva referente ao exemplo ilustrativo de cálculo da atividade metanogênica específica baseada na técnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989) para o teste com substrato.

4.7 - Resumo da Metodologia Utilizada no Desenvolvimento do Estudo do Teste de Atividade Metanogenica Específica.

Conforme mencionado anteriormente, este trabalho foi realizado em etapas, com objetivos específicos. Cada etapa foi composta por um conjunto de testes de atividade metanogênica que denominou-se de bloco de ensaios.

A Tabela 24 mostra um resumo dos 14 blocos de ensaios utilizados no desenvolvimento desse estudo, apresentando também os objetivos de cada um deles.

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica

Bloco de Ensaio	Lodo (1)	Amostra (1)	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
1º	ESGOTO SANITÁRIO LABORATÓRIO	A	03	Tentar reproduzir a técnica de Willem de Zeeuw (1984) para o teste de atividade metanogênica específica com lodo de digestor de esgoto doméstico e com lodo de reatores de manta de lodo.	- Análises de ácidos voláteis e de biogás - Testes em triplicata, conduzidos até o consumo total dos substratos.
		A, B, C e D	04		
2º	ESGOTO SANITÁRIO	B	33	Iniciar estudos de aprimoramento da metodologia proposta por de Zeeuw (1984) para o teste de atividade metanogênica específica. Basicamente estudar os efeitos da variação da concentração de SSV e dos ácidos voláteis (acético, propiônico e butírico) e do tempo de armazenamento do lodo nos resultados dos testes de atividades.	- Análises de ácidos voláteis - Testes em triplicata, conduzidos até o consumo total dos substratos.
3º	ESGOTO SANITÁRIO	C ₁ e C ₂	13	Estudar a influência nos resultados dos testes de atividade da: • concentração de SSV do teste, para uma mesma concentração dos ácidos voláteis e amostras de lodo com mesmo tempo de armazenamento; • concentração da amostra de lodo; • forma de agitação	- Testes com consumo total dos substratos

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica (continuação)

Bloco de Ensaio	Lodo	Amostra	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
4 ^o	ESGOTO SANITÁRIO	C ₃	10	Verificar como se comporta a atividade metanogênica quando se varia a relação entre a quantidade de substrato e de biomassa dos testes.	- Testes em duplicata, com consumo total dos substratos.
5 ^o	ESGOTO SANITÁRIO	D, C ₃	11	<p>Iniciar estudos utilizando-se os ácidos voláteis individualmente como substratos.</p> <p>Iniciar estudos de simplificação do teste com retirada das soluções de nutrientes e de metais.</p> <p>Verificar a necessidade da utilização de um teste "branco", ou seja, sem substrato.</p>	<p>- Análises de ácidos voláteis</p> <p>- Testes em duplicata, com consumo total dos substratos.</p>

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica (continuação)

Bloco de Ensaio	Lodo	Amostra	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
6 ^o	ESGOTO SANITÁRIO	E, F, G, H e I	82	<p>Pesquisar a concentração mais adequada de SSV e dos ácidos voláteis para o teste de atividade, realizando-se ensaios com quatro concentrações diferentes de SSV, cada qual ensaiada com cinco concentrações diferentes dos ácidos acético, propiônico e butírico em conjunto.</p> <p>Estudar o comportamento do teste de atividade, utilizando-se individualmente como substrato cada um dos ácidos voláteis citados. Todos eles ensaiados com cinco concentrações diferentes para uma mesma concentração de SSV do teste, definido como a mais adequada nos testes anteriores desse bloco.</p> <p>Estudar a simplificação dos testes através da comparação de ensaios realizados com agitação contínua e manual, com e sem as soluções de nutrientes e de metais e com e sem o fluxionamento de nitrogênio para a redução do meio.</p>	- Testes em duplicata, sem consumo total dos substratos

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica (continuação)

Bloco de Ensaio	Lodo	Amostra	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
7º	HERO (Indústria Alimentícia de Conservas Vegetais)	A	48	<p>Pesquisar para as condições do teste as concentrações mais adequadas dos ácidos acético, propiônico e butírico, usados individualmente e em conjunto como substratos para os testes de atividade com o lodo HERO.</p> <p>Estudar a simplificação dos testes com a eliminação das soluções de nutrientes e de metais e do fluxionamento de nitrogênio, bem como a substituição da agitação mecanizada pela manual.</p>	Testes em duplicata, sem consumo total dos substratos e com cinco concentrações diferentes dos ácidos voláteis em conjunto e individualmente.
8º	ANTARCTICA (Indústria de Refrigerantes e Cervejas)	A	48	<p>Pesquisar para as condições do teste as concentrações mais adequadas dos ácidos acético, propiônico e butírico, usados individualmente e em conjunto como substratos para os testes de atividade com o lodo ANTARCTICA.</p> <p>Estudar a simplificação dos testes com a eliminação das soluções de nutrientes e de metais e do fluxionamento de nitrogênio, bem como a substituição da agitação mecanizada pela manual.</p>	Testes em duplicata, sem consumo total dos substratos e com cinco concentrações diferentes dos ácidos voláteis em conjunto e individualmente.

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica (continuação)

Bloco de Ensaio	Lodo	Amostra	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
90	COOPERSUCAR (Indústria de Açúcar)	A	46	<p>Pesquisar para as condições do teste as concentrações mais apropriadas dos ácidos acético, propiônico e butírico, usados individualmente e em conjunto como substratos para os testes de atividade com o lodo COOPERSUCAR</p> <p>Estudar a simplificação dos testes com a eliminação das soluções de nutrientes e de metais e do fluxionamento de nitrogênio, bem como a substituição da agitação mecanizada pela manual.</p>	Testes em duplicata, sem consumo total dos substratos e com cinco concentrações diferentes dos ácidos voláteis em conjunto e individualmente.
100	SÃO MARTINHO (Indústria de Alcool)	A	50	<p>Pesquisar para as condições do teste as concentrações mais apropriadas dos ácidos acético, propiônico e butírico, usados individualmente e em conjunto como substratos para os testes de atividade com o lodo SÃO MARTINHO</p> <p>Estudar a simplificação dos testes com a eliminação das soluções de nutrientes e de metais e do fluxionamento de nitrogênio, bem como a substituição da agitação mecanizada pela manual.</p>	Testes em duplicata, sem consumo total dos substratos e com cinco concentrações diferentes dos ácidos voláteis em conjunto e individualmente.

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica (continuação)

Bloco de Ensaio	Lodo	Amostra	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
110	HERO ANTARCTICA de ESGOTO SÃO MARTINHO COOPERSUCAR	C A J A A	57	<p>Comparar os resultados dos testes de atividade através de ensaios com:</p> <p>(a) as condições metodológicas propostas por este estudo, utilizando-se como substrato os ácidos acético, propiônico e butírico;</p> <p>(b) as condições metodológicas propostas por este estudo, utilizando-se como substrato a própria água residuária que alimentava os reatores de onde se coletaram os lodos dessa pesquisa;</p> <p>(c) as condições metodológicas propostas por este estudo, utilizando-se frascos-reatores com volume útil igual a 1/5 (130 ml) do adotado para os testes desse estudo;</p> <p>(d) as condições metodológicas propostas por de Zeeuw (1984) com frascos-reatores de volume útil igual a 650 ml.</p>	<p>- Análise de ácidos voláteis dos testes nas condições (a) e (b) descritas nos objetivos.</p> <p>- Testes em triplicata, com consumo total dos substratos.</p>

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica (continuação)

Bloco de Ensaio	Lodo	Amostra	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
12º	HERO	C	20	Comparar os resultados dos testes de atividade com as condições metodológicas propostas por Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989)	
	ANTARCTICA	A			
	de ESGOTO	J			
	SÃO MARTINHO	A			
	COOPERSUCAR	A			
13º	HERO	C	57	Estudar a influência do tempo de armazenamento do lodo nos resultados dos testes de atividade metanogênica	- Testes em duplicata, com consumo total dos ácidos.
	ANTARCTICA	A			
	de ESGOTO	J			
	SÃO MARTINHO	A			
	COOPERSUCAR	A			

Tabela 24 - Resumo dos Testes de Atividade Metanogênica Específica (continuação)

Bloco de Ensaio	Lodo	Amostr a	Quantidade de testes	Objetivos	Observação
140	ESGOTO HERO	I B	24	Estudar o comportamento do teste de atividade metanogênica utilizando-se o ácido fórmico como substrato.	

(1) - A caracterização dos lodos e suas amostras são apresentadas nas Tabelas 25 e 26 em 5.2.5.1.

5 - RESULTADOS

5.1 - Considerações sobre resultados da pesquisa

No desenvolvimento da pesquisa foram realizados 457 testes de atividade metanogênica específica. Foram também necessários ensaios auxiliares, como o desenvolvimento e/ou adaptação de métodos para a determinação da composição do biogás e da concentração de ácidos voláteis por cromatografia gasosa e a determinação das concentrações de sólidos suspensos voláteis das amostras.

Esse desenvolvimento acabou por gerar alguns resultados que serão destacados adiante em item à parte denominado "Resultados Preliminares". Em seguida serão mostrados os resultados de caracterização das amostras de lodo ensaiadas e posteriormente serão apresentados os resultados dos testes de atividade metanogênica específica.

Conforme relatado no capítulo anterior, a natureza da pesquisa conduziu à realização do trabalho experimental em etapas. Cada uma destas etapas possuía um objetivo específico dentro do objetivo maior do trabalho, e, foram sendo definidas, muitas vezes, em função dos resultados das etapas anteriores. Assim sendo, achou-se conveniente apresentar os resultados de forma agrupada, representados por blocos de ensaios com aqueles objetivos específicos comuns.

5.2 - Resultados Preliminares

5.2.1 - Otimização das condições de separação dos ácidos voláteis nas análises cromatográficas

Na pesquisa de otimização das condições de separação, utilizou-se as condições cromatográficas sugeridas por Vieira & Souza (1985), referentes às temperaturas do detector e injetor e as vazões dos gases da chama e de arraste que foram descritas no item 4.3. Foi pesquisada a temperatura ótima para a coluna, ou seja, aquela temperatura que conduzissem a um cromatograma com uma boa resolução.

Inicialmente, tentou-se trabalhar, com temperatura isotérmica pelas vantagens que ela oferece, como menor tempo de análise e maior facilidade de operação. Entretanto, após várias tentativas, optou-se por trabalhar com temperatura variável (com variação programada), pois não se conseguiu um cromatograma bem resolvido com temperatura constante.

Testando-se injeções de amostra para várias temperaturas, conseguiu-se um cromatograma com boa resolução nas seguintes condições, descritas em Materiais e Métodos:

- temperatura inicial de aquecimento da coluna: 80°C
- programa linear de aquecimento da coluna: 10°C/min.
- temperatura final de aquecimento da coluna: 200°C

Com temperatura programada, os intervalos de tempo entre uma injeção e outra chegavam em média a 30 minutos, em face da necessidade de se resfriar a coluna a cada nova injeção. Porém, foi a condição que permitiu uma boa separação dos ácidos da amostra e que, ao mesmo tempo,

realizava um recondicionamento da coluna com o seu aquecimento até 200°C.

5.2.2 - Quantificação dos ácidos

Para a determinação das quantidades de cada ácido da amostra, foi necessário obter-se as curvas de calibração na faixa de concentrações desejada.

A calibração foi feita para uma faixa de concentrações entre 50 mg/l e 1000 mg/l, por ser o intervalo de concentrações da maioria das amostras de ácidos analisadas.

Amostras em concentrações maiores eram diluídas antes da injeção, para valores dentro da faixa de calibração.

Em virtude da perda de eficiência da coluna, devido ao uso, foram utilizadas 3(três) colunas durante o trabalho.

Assim sendo, foram necessárias 3(três) curvas de calibração, que são apresentadas a seguir.

- 1ª Calibração

Utilizada na quantificação das amostras de ácidos dos testes R₄ a R₇ do 1º Bloco de Ensaio.

- Ácidos utilizados : acético, propiônico, butírico e valérico
- Concentração de cada 50,0; 100,0; 200,0;
ácido das amostras : 400,0; 700,0 e 1000,0
padrão (mg/l)
- Concentração de ácido : 250
crotônico (mg/l)

- 2ª Calibração

Utilizada na quantificação das amostras de ácidos dos testes do 5º Bloco de Ensaio.

- . Ácidos utilizados : acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico
- . Concentração de cada 50,0; 100,0; 200,0; ácido das amostras : 300,0; 350,0, 400,0; padrão (mg/l) 500,0; 575,0; 750,0 e 1000,0
- . Concentração de ácido : 250 crotônico (mg/l)

- 3ª Calibração

Utilizada na quantificação das amostras de ácidos do 11º Bloco de Ensaio

- . Ácidos utilizados : acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico
- . Concentração de 50,0; 100,0; 200,0; cada ácido das amostras : 300,0; 400,0; 600,0; padrão (mg/l) 800,0; e 1000,0
- . Concentração de ácido : 250 crotônico (mg/l)

Como a relação entre a maior e menor massa de ácido das amostras padrão nas três calibrações foi igual a 20, este valor encontrava-se dentro da faixa dinâmica linear do detector de ionização de chama, que é igual a 10^7 (Ciola, 1985). Assim, os pontos obtidos na calibração se ajustaram à uma reta do tipo da Equação (13), apresentada em 4.3.1.

As Tabelas 01, 02, 03 apresentadas no anexo deste trabalho resumem os resultados obtidos de cromatogramas,

com 5 (cinco) injeções de cada amostra padrão.

Com os dados de (A_i/A_{pi}) médio nas diversas concentrações foram traçadas as curvas de calibração para cada um dos ácidos. Estas curvas são apresentadas nas Figuras (29), (30), (31) e (32).

Utilizando-se do método de regressão linear, foram obtidas as seguintes equações que definiram as concentrações dos ácidos em função da relação $(A_{\text{ácido}}/A_{\text{padrão}})$.

Para a 1ª calibração

$$C_{Ac} = 429,118 \frac{A_{Ac}}{A_p} - 16,5 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (15)$$

$$R = 0,998$$

$$C_{Pr.} = 250 \frac{A_{Pr.}}{A_p} - 13,7 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (16)$$

$$R = 0,999$$

$$C_{But.} = 196,08 \frac{A_{But.}}{A_p} - 6,7 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (17)$$

$$R = 1$$

$$C_{Val.} = 185,18 \frac{A_{Val.}}{A_p} - 10,3 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (18)$$

$$R = 0,999$$

em que,

$C_{Ac.}$; $C_{Pr.}$; $C_{But.}$ e $C_{Val.}$: Concentração dos ácidos acético, propiônico, butírico e valérico, respectivamente.

$A_{Ac.}$; $A_{Pr.}$; $A_{But.}$; $A_{Val.}$: áreas dos ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e crotônico (padrão interno), respectivamente, fornecidas pelo integrador.

R : Coeficiente de correlação da reta ajustada.

Para a 2ª Calibração

- 1º Trecho -

Para concentrações até 350mg/l

Relações A_i/A_p até:

Para o ácido acético: 0,616

Para o ácido propiônico: 1,169

Para o ácido isobutírico: 2,009

Para o ácido butírico: 1,693

Para o ácido isovalérico: 2,103

Para o ácido valérico: 1,903

$$C_{Ac} = 620 \frac{A_{Ac.}}{A_p} + 0,5 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (19)$$

$$R = 0,999$$

$$C_{Pr.} = 289,1 \frac{A_{Pr.}}{A_p} + 0,6 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (20)$$

$$R = 0,998$$

$$C_{Isob.} = 160,4 \frac{A_{Isob.}}{A_p} + 8,2 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (21)$$

$$R = 0,991$$

$$C_{But.} = 193,9 \frac{A_{But.}}{A_p} + 4,3 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (22)$$

$$R = 0,996$$

$$C_{Isov.} = 151,4 \frac{A_{Isov.}}{A_p} + 6,2 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (23)$$

$$R = 0,997$$

$$C_{Val.} = 171,8 \frac{A_{Val.}}{A_p} + 4,0 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (24)$$

$$R = 0,997$$

em que,

$C_{Isob.}$; $C_{Isov.}$; $A_{Isob.}$ e $A_{Isov.}$ - Concentrações e áreas dos ácidos isobutírico e isovalérico, respectivamente.

- 2º Trecho -

Válido para concentrações entre 350 mg/l e 1000 mg/l

Relações A_i/A_p entre:

Para o ácido acético: 0,616 e 1,647

Para o ácido propiônico: 1,169 e 2,817

Para o ácido isobutírico: 2,009 e 4,893

Para o ácido butírico: 1,693 e 4,212

Para o ácido isovalérico: 2,103 e 5,344

Para o ácido valérico: 1,903 até 4,636

$$C_{Ac} = 591,7 \frac{A_{Ac.}}{A_p} + 38,0 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (25)$$

$$R = 0,991$$

$$C_{Pr.} = 364,7 \frac{A_{Pr.}}{A_p} - 30,0 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (26)$$

$$R = 0,991$$

$$C_{Isob.} = 223,8 \frac{A_{Isob.}}{A_p} - 94,5 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (27)$$

$$R = 0,985$$

$$C_{But.} = 252,8 \frac{A_{Isob.}}{A_p} - 65,8 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (28)$$

$$R = 0,994$$

$$C_{Isov.} = 194,3 \frac{A_{Isov.}}{A_p} - 41,6 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (29)$$

$$R = 0,995$$

$$C_{Val.} = 231,6 \frac{A_{Val.}}{A_p} - 72,0 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (30)$$

$$R = 0,991$$

Para a 3ª Calibração

$$C_{Ac.} = 488,24 \frac{A_{Ac.}}{A_p} - 2,6 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (31)$$

$$R = 0,993$$

$$C_{Pr.} = 253,76 \frac{A_{Pr.}}{A_p} - 34,8 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (32)$$

$$R = 0,983$$

$$C_{Isob.} = 183,67 \frac{A_{Isob.}}{A_p} - 58,8 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (33)$$

$$R = 0,996$$

$$C_{But.} = 202,73 \frac{A_{But.}}{A_p} - 56,9 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (34)$$

$$R = 0,997$$

$$C_{Isov.} = 162,07 \frac{A_{Isov.}}{A_p} - 64,3 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (35)$$

$$R = 0,997$$

$$C_{Val.} = 188,56 \frac{A_{Val.}}{A_p} - 57,0 \text{ mg/l} \dots\dots\dots (36)$$

$$R = 0,997$$

1ª Calibração

1ª Calibração

Figura 29 - Curvas da 1ª Calibração dos Ácidos Voláteis

2ª Calibração (1º trecho)

2ª Calibração (1º trecho)

Figura 30 - Curvas da 2ª Calibração dos Ácidos Voláteis (1º Trecho)

2ª Calibração (2º trecho)

2ª Calibração (2º trecho)

Figura 31 - Curvas da 2ª Calibração dos Ácidos Voláteis (2º Trecho)

3ª Calibração

3ª Calibração

Figura 32 - Curvas da 3ª Calibração dos Ácidos Voláteis

5.2.3 - Medidas de sólidos suspensos voláteis (SSV) dos lodos

As medidas de concentração de SSV dos lodos foram realizadas conforme a metodologia descrita em 4.5.2. Com o objetivo de se confirmar a validade daquela metodologia foi realizado um teste com medidas da concentração de SSV de uma amostra de lodo de digestor de esgoto doméstico. Os resultados dessas medidas encontram-se na tabela 24.

Tabela 24 - Valores de SSV (g/l) obtidos na avaliação da metodologia de centrifugação para medida da concentração de SSV de uma amostra de lodo de digestor de esgoto doméstico

Alíquota nº	Volume (ml)	SSV(g/l) Metodologia adotada (centrifugação)	SSV(g/l) Porção sobrenadante Metodologia do "Standard Methods" (filtração)	SSV total(g/l) (1) + (2)	Diferença (%) $\frac{(3)-(1)}{(3)} \times 100$
		(1)	(2)	(3)	
1	20	37,18	0,21	37,33	0,56
2	20	38,20	0,08	38,28	0,21
3	20	37,47	0,19	37,66	0,50
4	20	37,92	0,10	38,02	0,26

5.2.4 - Medidas de volumes de metano

- a) Para as medidas por sistema de deslocamento de líquido (técnica adotada por de Zeeuw, 1984)

Para verificar a eficiência de retenção do dióxido de carbono (CO₂) com a técnica descrita em 4.6.a. foram analisadas amostras de biogás antes e após a passagem pela solução de hidróxido de sódio, coletadas respectivamente dos pontos 5 e 6 da Figura 23.

Os Cromatogramas 04 e 05 confirmaram essa retenção.

Estas análises eram feitas a cada bloco de testes.

Cromatograma 04 - Análise de biogás antes da passagem pela solução de hidróxido de sódio.

Cromatograma 05 - Análise de biogás após a passagem pela solução de hidróxido de sódio.

Foi verificada ainda a possibilidade de perda por evaporação do líquido coletado na proveta do sistema de medição de metano (ponto 7 da Figura 23). Para tanto realizou-se o seguinte teste:

encheram-se 5(cinco) provetas de 50ml com 5; 10; 15; 20 e 30ml da solução (2%) de hidróxido de sódio (NaOH-2%) do gasômetro e deixaram-se abertas na estufa à 30°C. Após 24(vinte e quatro) horas, não foi observada qualquer alteração nos volumes iniciais de hidróxido de sódio.

Como as provetas permaneciam sempre menos do que 24 horas com o líquido na estufa (eram esvaziadas no mínimo uma vez ao dia), não observou-se perda de líquido nesta temperatura. Para os testes realizados com a temperatura de 56°C, a possibilidade de perda por evaporação foi controlada com o esvaziamento das provetas de hora em hora, face às altas taxas de metano produzidas.

- b) Para as medidas por sistema de acumulação do biogás no espaço livre dos frasco-reactores (técnica adotada por Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989)

Foi obtida uma curva padrão relacionando-se volumes de metano injetados com as áreas fornecidas pelos cromatogramas (apresentados na Tabela 04 em Anexos).

Com os valores médios de volume real de metano injetado e as médias das áreas obtidas com cinco injeções, traçou-se a curva de calibração apresentada na Figura 33. A relação entre a maior e menor massa de metano injetada foi igual a 10^2 , valor este encontrado dentro da faixa dinâmica linear do detector de condutividade térmica que é igual à 10^4 (Ciola, 1985). Assim, os pontos de curva padrão pesquisada deveriam se ajustar a uma reta.

Ajustados os pontos pelo método de regressão linear, chegou-se à seguinte equação da reta:

$$CH_4 = 1,085 \cdot 10^{-5} A_{CH_4} + 0,00018 \text{ ml} \quad \dots\dots\dots (37)$$

$$R = 0,999$$

Figura 33 - Curva padrao de metano utilizado no calculo dos volumes de metano medidos pela tecnica de Dubourguier, 1989 apud Vazoller (1989)

5.2.5 - Resultados da caracterização das amostras de lodos e das águas residuárias utilizadas como substrato.

Os parâmetros utilizados na caracterização das amostras de lodos foram a concentração de sólidos totais fixos e voláteis. Para as águas residuárias foram empregados os parâmetros pH, DQO alcalinidade e ácidos voláteis, cujos resultados encontram-se na Tabela 28.

5.2.5.1 - Caracterização das amostras de lodo de digestor de esgoto doméstico

As amostras desse lodo foram coletadas do biodigestor convencional de lodo de esgoto doméstico da Estação de Tratamento de Esgotos de Pinheiros, situada em São Paulo -SP e administrada pela SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. A Tabela 27 apresenta algumas características desse digestor.

Em função do desenvolvimento do trabalho foram utilizadas 10(dez) amostras desse lodo, coletadas ao longo de 20(vinte) meses. Esse lodo é identificado neste texto como lodo de ESGOTO. A caracterização das amostras é mostrada na Tabela 25.

5.2.5.2 - Caracterização das amostras dos reatores de manta de lodo

a - Reatores de Bancada de Laboratório

As amostras desse lodo foram coletadas de três reatores de manta de lodo de 10 litros cada, utilizados em pesquisas de digestão anaeróbia no Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. Os três reatores foram inoculados com o mesmo lodo de ESGOTO relatado em 5.2.5.1 .

Dois dos reatores eram alimentados com glicose e o terceiro com o efluente de um reator acidogênico, que também era alimentado com glicose.

As Tabelas 26 e 27 apresentam, respectivamente, as características das amostras de lodo e dos reatores. Os lodos desses reatores são identificados neste trabalho como lodo de LABORATÓRIO.

b - Reator da Conservas Alimentícias Hero

As amostras desse lodo foram coletadas de um dos reatores de manta de lodo, utilizados no tratamento de águas residuárias da Empresa Conservas Alimentícias Hero, situada na cidade de São Carlos - SP.

As Tabelas 26 e 27 apresentam, respectivamente, a caracterização das amostras de lodo e do reator. O lodo desse reator é identificado neste trabalho como lodo HERO.

c - Reator da Coopersucar

A amostra desse lodo foi coletada em um reator de manta de lodo em escala piloto, utilizado no tratamento de águas residuárias de uma indústria de açúcar de cana de propriedade da empresa Coopersucar, situada no bairro Piedade na cidade do Rio de Janeiro - RJ.

As Tabelas 26 e 27 apresentam, respectivamente, a caracterização da amostra de lodo e do reator.

Esse lodo é identificado neste texto como lodo COOPERSUCAR.

d - Reator da Antartica

A amostra desse lodo foi coletada em um reator metanogênico (processo de duas fases) que trata águas residuárias de uma indústria de cerveja e refrigerantes de propriedade da Antartica, situada na cidade de Ribeirão Preto - SP.

As Tabelas 25 e 26 apresentam, respectivamente, a caracterização da amostra de lodo e do reator.

Esse lodo é identificado como lodo ANTARCTICA.

e - Reator da São Martinho

Essa amostra de lodo foi coletada de um reator termofílico de uma instalação piloto utilizada no desenvolvimento do processo anaeróbico de tratamento de águas residuárias de uma indústria de álcool (vinhaça). A indústria é a São Martinho, que fica no município de Pradópolis, no Estado de São Paulo.

As Tabelas 26 e 27 apresentam, respectivamente, a caracterização da amostra de lodo e do reator.

Esse lodo é identificado como lodo SÃO MARTINHO.

Tabela 25 - Caracterização das amostras do lodo de esgoto doméstico em digestão.

Amostras	Coleta	Análise	Sólidos Suspensos Totais (g/l)	Sólidos Suspensos Fixos (g/l)	Sólidos Suspensos Voláteis (g/l)	pH	
A	05/01/89	19/01/89	104,71	60,98	43,73	7,10	
			106,44	63,11	43,33		
			103,74	60,45	43,39		
			105,00	61,51	43,48		
B	31/03/89	05/04/89	110,76	66,02	44,74	7,15	
			109,34	65,28	44,06		
			108,33	63,57	44,76		
				109,48	64,96	44,52	
		25/04/89	103,58	62,84	40,74	7,10	
			102,40	61,90	40,50		
			102,82	62,20	40,62		
				102,93	62,31	39,56	
		22/05/89	102,98	62,95	40,03	7,10	
			101,67	62,45	39,22		
			102,20	62,78	39,42		
				102,28	62,73	40,62	
22/06/89	99,53	62,18	37,35	7,00			
	98,36	61,56	36,80				
	98,45	61,22	37,23				
		98,78	61,65	37,13			
C ₁ amostra mais concen- trada	30/08/89	01/09/89	83,12	43,27	39,85	7,20	
81,51			43,81	37,70			
		81,24	43,99	37,25			
		81,96	43,99	38,27			
C ₂ amostra mais diluída		01/09/89	28,66	14,53	14,13	7,10	
			29,14	14,71	14,43		
			28,57	15,14	13,43		
			28,79	14,79	14,00		
C ₃ mistura de C ₁ com C ₂		22/10/89	37,85	19,78	18,07	7,10	
			37,21	20,45	16,76		
			38,11	20,60	17,51		
			37,72	20,28	17,45		

Tabela 25 - Caracterização das amostras do lodo de esgoto doméstico em digestão (continuação)

Amostras	Coleta	Análise	Sólidos Suspensos Totais (g/l)	Sólidos Suspensos Fixos (g/l)	Sólidos Suspensos Voláteis (g/l)	pH
D	06/12/89	07/12/89	55,65 55,70 55,37	29,70 29,77 29,65	25,95 25,93 25,72	7,10
			55,57	29,71	25,87	
E	14/03/90	15/03/90	57,80 57,62	35,68 35,14	22,12 22,48	7,00
			57,71	35,41	22,30	
F	25/03/90	26/03/90	59,37 58,87 59,05	36,39 35,23 35,91	22,98 23,64 23,14	7,00
			59,10	35,84	23,25	
G	18/04/90	18/04/90	48,13 47,80 47,61	32,36 31,75 31,69	15,77 16,05 15,92	7,10
			47,84	31,93	15,91	
H	28/04/90	28/04/90	42,42 43,10 43,04	19,84 19,45 19,58	22,58 23,65 23,46	6,85
			42,85	19,62	23,23	
I	03/05/90	04/05/90	61,52 60,57 61,19	38,24 37,43 37,75	23,28 23,14 23,44	7,10
			61,09	37,81	23,29	
J	14/09/90	18/09/90	29,27 29,65 28,95	16,61 16,84 16,23	12,66 12,81 12,72	7,30
			29,29	16,56	12,73	

Tabela 26 - Caracterização das amostras de lodo dos reatores de manta de lodo

Amostras	Coleta	Análise	Sólidos Suspensos Totais (g/l)	Sólidos Suspensos Fixos (g/l)	Sólidos Suspensos Voláteis (g/l)	pH
LODO HERO						
A	28/05/90	28/05/90	33,96 33,60 35,20	4,73 4,80 4,62	29,23 28,80 30,58	6,70
			34,25	4,72	29,54	
B	22/06/90	22/06/90	26,84 26,23 26,19	3,33 3,79 3,71	23,51 22,44 22,48	6,60
			26,42	3,61	22,81	
C	14/08/90	14/08/90	30,05 29,79 29,79	4,73 4,69 4,73	25,32 25,10 25,06	7,00
			29,88	4,72	25,16	
		21/01/91	27,73	4,49	23,24	6,90
LODO COOPERSURCAR						
A	18/08/90	04/05/90	62,88 58,04 62,50	18,73 17,82 19,09	44,15 40,22 43,41	6,90
			61,14	18,55	42,59	
		05/12/90	55,35	18,71	36,64	6,90

Tabela 26 - Caracterização das amostras de lodo dos reatores de mancha de lodo (continuação)

Amostras	Coleta	Análise	Sólidos Suspensos Totais (g/l)	Sólidos Suspensos Fixos (g/l)	Sólidos Suspensos Voláteis (g/l)	pH	
LODO ANTARCTICA							
A	28/05/90	03/07/90	49,27	6,24	43,03	7,00	
			49,10	6,32	42,78		
		16/09/90	49,12	6,18	42,94	7,00	
			49,16	6,25	42,92		
			51,87	6,64	45,23		7,00
				51,59	6,60		
		53,02	6,54	46,48	6,90		
			52,16	6,59		45,57	
21/01/91	44,04	5,72	38,32				
LODO SÃO MARTINHO							
A	30/08/90	30/08/90	63,76	18,96	44,80	7,00	
			58,97	17,53	41,44		
		05/12/91	62,17	18,52	43,65	6,90	
			61,63	18,34	43,30		
LODO DE LABORATÓRIO							
A	03/03/89	03/03/89	70,33	39,32	31,01	6,95	
B	21/03/89	21/03/89	66,37	33,24	33,13	7,00	
C	21/03/89	21/03/89	64,14	31,89	32,25	7,00	
D	21/03/89	21/03/89	64,54	35,08	29,46	7,00	

Tabela 27 - Caracterização dos reatores que forneceram amostras de lodo para a pesquisa

REATORES	VOLUME (m ³)	Tempo de retenção hidráulico (horas)	Tempo de Retenção Celular (dias)	Taxa de Carga Orgânica (KgDQO/m ³ dia)	Tempo de Operação (anos)
DIGESTOR DE ESGOTO		672	—		
HERO	88	12	100	0,50	4
COOPERSUCAR	12	16	—		2
ANTARCTICA	800	12,8			3
SÃO MARTINHO	75	10,8	—	26,5	

Tabela 28 - Caracterização das águas residuárias utilizadas como substratos para os teste de atividade metanogênica

ÁGUAS RESIDUÁRIAS	pH	DQO (mg/l)	Alcalinidade (mg/l de CaCO ₃)	Ácidos Voláteis (mg/l)
HERO	7,30	340	—	Ac. Acético: 318mg/l (*)
COOPERSUCAR	4,65	2200	110,4	Ac. Acético: 359mg/l Ac. Propiônico: 117mg/l Ac. Butínico: 101 mg/l (*)
ANTARCTICA	6,45	1060	680,0	Ac. Acético: 568mg/l Ac. Propiônico: 215mg/l Ac. Butínico: 66 mg/l
SÃO MARTINHO	6,35	24000	—	Ac. Acético: 2043mg/l Ac. Propiônico: 429mg/l (*)

(*) Pico grande de etanol no início do cromatograma

5.3 - Resultados dos testes de Atividade Metanogênica Específica

As Tabelas de 29 a 42 apresentam um resumo da caracterização e dos resultados de cada teste dos blocos de ensaios e as Figuras de 34 a 268 mostram as curvas de atividade dos testes.

As Tabelas de 5 a 239 referentes às curvas das figuras 34 a 268 são apresentadas no anexo deste trabalho. Para os testes onde foram feitas análises de ácidos voláteis são apresentadas as figuras com as curvas de degradação de cada um dos ácidos analisados. As Tabelas com os resultados destas análises encontram-se também no anexo deste trabalho.

Nas análises de composição do biogás são apresentados resultados com as porcentagens de cada gás na amostra. Entretanto, a grande maioria das análises de biogás foi utilizada para medir a produção de metano, nos testes com a metodologia de Dubourguier apud Vazoller (1989).

No rodapé das Tabelas de 29 a 42 são apresentadas algumas observações para melhor identificação dos testes. Apesar dessas observações serem mais adequadas ao capítulo Materiais e Métodos, preferiu-se apresentá-las naqueles locais por uma questão didática. Entendeu-se que dessa forma facilitaria o trabalho de análise do leitor.

Algumas abreviaturas usadas nas Tabelas 29 a 42 significam:

• DQO_{teor}	- Demanda química de oxigênio teórica, ou seja, calculada estequiometricamente em função da quantidade de substrato usada no teste.

. Relação
gDQO _{teor} /gSSV	-	relação entre a quantidade de DQO _{teor} do substrato e a quantidade de sólidos suspensos voláteis (SSV) utilizada no início do teste.
. Produção de Metano
Teórica Esperada	-	quantidade de metano em ml prevista através de cálculos estequiométricos em função da DQO _{teor} do teste.
. Produção de Metano
Total Medida	-	quantidade acumulada de metano em ml medida após o consumo total do substrato do teste.

Outras observações:

- . nos espaços das Tabelas 29 a 42 em que aparecem a indicação, - , significa que aquele parâmetro não foi analisado naquele teste;
- . nos testes em que foram utilizadas as águas residuárias como substrato (Tabelas do 11º bloco de ensaios) a quantidade de substrato empregada no teste é apresentada como um determinado volume de resíduo, no espaço reservado para a indicação da concentração inicial de ácidos voláteis do teste.