



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

IZABELA PAIVA MARTINS

**INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE SEMENTE DE *Moringa oleifera* NA ATIVIDADE
METANOGÊNICA ESPECÍFICA DE LODO ANAERÓBIO**

CAMPINAS

2024

IZABELA PAIVA MARTINS

**INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE SEMENTE DE *Moringa oleifera* NA ATIVIDADE
METANOGÊNICA ESPECÍFICA DE LODO ANAERÓBIO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, na área de água e solo.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Mockaitis

Coorientador: Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA IZABELA PAIVA MARTINS, E ORIENTADA PELO PROF. DR. GUSTAVO MOCKAITIS.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M366i Martins, Izabela Paiva, 1992-
Influência do extrato de semente de Moringa oleifera na atividade metanogênica específica de lodo anaeróbico / Izabela Paiva Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Gustavo Mockaitis.
Coorientador: Ariovaldo José da Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Biogas. 2. Digestão anaeróbia. 3. Metano. 4. Moringa oleifera. 5. Nutrientes. I. Mockaitis, Gustavo, 1979-. II. Silva, Ariovaldo José da, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Influence of Moringa oleifera seed extract on the specific methanogenic activity of anaerobic sludge

Palavras-chave em inglês:

Biogas

Anaerobic digestion

Methane

Moringa oleifera

Nutrient

Área de concentração: Água e Solo

Titulação: Doutora em Engenharia Agrícola

Banca examinadora:

Gustavo Mockaitis [Orientador]

Guilherme Peixoto

Juliana Martins Valença

Maria Paula Cardeal Volpi

Oscar Fernando Herrera Adarme

Data de defesa: 19-01-2024

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2851-5199>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/5759771827613042>

Este exemplar corresponde à redação final da **Tese de Doutorado** defendida por **Izabela Paila Martins**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de Janeiro de 2024, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

FEAGRI

Prof. Dr. Gustavo Mockaitis – Presidente e Orientador

Dr. Guilherme Peixoto – Membro Titular

Dra. Juliana Martins Valença – Membro Titular

Dra. Maria Paula Cardeal Volpi – Membro Titular

Dr. Oscar Fernando Herrera Adarme – Membro Titular

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que mesmo em dias difíceis sempre me deu a força necessária para continuar, nunca deixou faltar nada e me agraciou com saúde e oportunidades ao longo da jornada.

Ao meu esposo Davidson Freitas que sempre me incentivou a continuar e compreendeu as dificuldades encontradas no caminho.

Aos meus pais, Júlia e Arnaldo, que mesmo distantes me apoiaram e sempre me ensinaram a correr atrás do impossível.

Aos meus irmãos, Stefani, Gustavo e Gláucia, que sempre me proporcionaram momentos de distração, acrescentando sanidade nos meus dias.

Ao meu orientador Gustavo Mockaitis por todo ensinamento, conhecimento transmitido, paciência e dedicação.

Às amigas que o doutorado proporcionou, Juliana Martins Valença, Maria Paula Giulianette de Almeida, Maria Lídia Carra, Nicolás Duarte Cano, Maria Paula Cardeal Volpi, Fabianne Vieira, Breno Lima, foi ótimo estar com vocês todos os dias. Obrigada pelo apoio, ajuda e momentos inesquecíveis de descontração ao longo desses anos.

Ao técnico do laboratório de biotecnologia da FEAGRI, Giovani Brotto, obrigada por todo o suporte, ensinamento, paciência e diversão no dia a dia.

Aos docentes da FEAGRI pelo conhecimento compartilhado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com subsídios da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo processo nº2018/18802-0.

Muito obrigada!

“Aonde fica a saída?” Perguntou Alice ao gato que ria.

“Depende”, respondeu o gato.

“De quê?”, replicou Alice.

“Depende de para onde você quer ir...”

(Alice no país das maravilhas)

RESUMO

A *Moringa oleifera* é uma árvore considerada excelente fonte nutricional e coagulante, tendo sua semente utilizada como extrato aquoso no auxílio de tratamentos anaeróbios de efluente. A digestão anaeróbia é um processo realizado por grupos de microrganismos que atuam na ausência de oxigênio convertendo compostos orgânicos complexos em biogás. Para potencializar a produção de metano nos tratamentos anaeróbios podem ser realizados ensaios de atividade metanogênica específica (Ame) com a finalidade de verificar a capacidade dos microrganismos em converter compostos orgânicos em metano. O presente estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato da semente de *Moringa oleifera* em um lodo anaeróbio. A forma como os ensaios de atividade metanogênica específica são realizados foi revisado, afim de determinar um protocolo e as variáveis mais interferentes. As variáveis selecionadas foram testadas para obter os melhores valores de Ame, foi avaliado como fonte de substrato, ácido acético, um mix de ácidos acético, propiônico e butírico, nas concentrações de 500, 1000 e 2000 mgO₂ L⁻¹, diferentes relações substrato /microrganismos no intervalo de 0,2 a 4 gO₂ gSVT⁻¹, pH no intervalo de 4 a 10 e agitação de 0, 40, 70 e 100 rpm. Posteriormente foi aplicado o extrato de 2,5mg do pó da semente de *Moringa oleifera* por litro de água destilada nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mL L⁻¹ para a análise de sua interferência na Ame. Foram conduzidos também, concomitante, dois ensaios controle, um com acréscimo de meio nutriente e sem extrato de *Moringa oleifera* e outro sem meio nutricional e sem extrato. Foi considerado ácido acético como substrato na concentração de 1000 mgO₂ L⁻¹, na relação substrato/microrganismo de 0,5 gO₂ gSVT⁻¹, pH 8 e agitação de 40 rpm. Os resultados mostraram que, apesar de não ter diferença significativa entre as diferentes concentrações, a concentração de 1,0mL L⁻¹ de extrato beneficia a velocidade de reação dos reatores bem como a degradação da matéria orgânica, sendo que o excesso de extrato pode inibir o metabolismo microbiano. O extrato de *Moringa oleifera* pode ser utilizado como fonte nutricional para a digestão anaeróbia, substituindo fontes de nutrientes químicas de alto custo. A não utilização de um meio nutriente pode afetar o processo de digestão anaeróbia inibindo a produção de metano.

Palavras-chave: biogás, digestão anaeróbia, metano, *Moringa oleifera*, nutriente.

ABSTRACT

Moringa oleifera is a tree considered an excellent nutritional and coagulant source, with its seed used as an aqueous extract to aid anaerobic effluent treatments. Anaerobic digestion is a process carried out by groups of microorganisms that act in the absence of oxygen, converting complex organic compounds into biogas. To enhance methane production in anaerobic treatments, specific methanogenic activity (Sma) tests can be carried out in order to convert organic compounds into methane. The present study aimed to evaluate the effect of different concentrations of *Moringa oleifera* seed extract in an anaerobic sludge. The way specific methanogenic activity assays are carried out was reviewed in order to determine a protocol and the most interfering variables. The select variables were tested to obtain the best Sma values, acetic acid, a mix of acetic, propionic and butyric acids, at concentrations of 500, 1000 and 2000 mgO₂ L⁻¹, different substrate/microorganisms in the range of 0.2 to 4 gO₂ gVST⁻¹, pH in the range of 4 to 10 and agitation of 0, 40, 70 and 100 rpm. Subsequently, an extract of 2.5 mg of *Moringa oleifera* seed powder was applied per liter of distilled water at concentrations of 0.5, 1 e 2 mL L⁻¹ to analyze its interference with Sma. Two control trials were also conducted concomitantly, one with the addition of nutrient medium and without *Moringa oleifera* extract and the other without nutritional medium and without extract. Acetic acid was considered as substrate at a concentration of 1000 mgO₂ L⁻¹, at a substrate/microorganism ratio of 0.5 gO₂ gVST⁻¹, pH 8 and agitation at 40 rpm. The results showed that, despite there being no significant difference between the different concentrations the concentration of 1.0 mL L⁻¹ of extract benefits the reaction speed of the reactors as well as the degradation of organic matter, and excess extract can inhibit microbial metabolism. *Moringa oleifera* extract can be used as a nutritional source for anaerobic digestion, replacing high-cost chemical nutrient sources. Failure to use a nutrient medium can affect the anaerobic digestion process, inhibiting methane production.

Key-words: biogas, anaerobic digestion, methane, *Moringa oleifera*, nutrient.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO 1: ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA: REVISÃO	14
1 Introdução.....	15
2 Método Geral: condução experimental.....	16
3 Métodos de medição do biogás: Quantificação e qualificação.....	18
3.1 Métodos manométricos	18
3.2 Métodos Volumétricos	20
3.2.1 Medição do volume e composição do biogás.....	20
3.2.2 Medição apenas da composição do biogás	21
3.2.3 Medição direta do volume de metano	21
4 Revisão de literatura: variáveis interferentes.....	23
3.1 Medição do biogás.....	27
3.2 Solução nutriente	28
3.2 Substratos e Inóculo	28
4 Conclusão	30
5 Referências	31
CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DO SUBSTRATO E CONCENTRAÇÃO, RELAÇÃO SUBSTRATO MICRORGANISMO, PH E AGITAÇÃO EM ENSAIOS DE ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA DE LODO ANAERÓBIO.....	35
1 Introdução.....	36
2 Materiais e métodos.....	38
2.1 Substrato e inóculo	38
2.2 Atividade Metanogênica Específica	39
2.2.1 Fase Ia do ensaio de AME.....	41
2.2.2 Fase Ib do ensaio de AME.....	42
2.2.3 Fase Ic e Id do ensaio de AME.....	43
2.3 Análises	44
2.3.1 Cinética e análise do biogás e da matéria orgânica	45
3 Resultados e discussão	45
3.1 Fase Ia.....	46

3.2 Fase Ib	52
3.3 Fase Ic.....	53
3.4 Fase Id	56
4 Conclusões.....	58
5 Referências	58
CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE <i>Moringa oleifera</i> NA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA	
1 Introdução.....	62
2 Materiais e métodos.....	63
2.1 Inóculo e condições experimentais.....	64
2.2 Extrato de <i>Moringa oleifera</i>	64
2.3 Análises	66
2.3.1 Cinética da matéria orgânica e análise do biogás	67
3 Resultados e discussão	68
4 Conclusão	73
5 Referências	73
2 Materiais e métodos.....	75
2.1 Inóculo e condições experimentais.....	75
2.2 Extrato de <i>Moringa oleifera</i>	75
2.3 Análises	77
2.3.1 Cinética da matéria orgânica e análise do biogás	78
3 Resultados e discussão	79
4 Conclusão	84
5 Referências	84
CONCLUSÕES FINAIS	
PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS	
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO GERAL

A *Moringa oleifera* é uma árvore originária da Índia e sul do Himalaia, hoje já difundida em diversas regiões do mundo e em toda a América do Sul, tendo se adaptado bem ao clima tropical. É conhecida pelo seu alto valor nutricional e capacidade coagulante, podendo aproveitar todas as suas partes como fonte de nutriente, o que vem sendo utilizado amplamente pelo mundo afim de melhorar a saúde e combater a desnutrição em regiões mais pobres. Como coagulante é utilizada sua semente, sendo já há algum tempo empregada em regiões mais escassas da Ásia, África e Nordeste brasileiro, afim de tratar a água de consumo das comunidades.

Outra utilização das sementes de *Moringa oleifera* são como auxiliares no tratamento anaeróbio de diversos efluentes. A semente dessa árvore é transformada em extrato aquoso e utilizado para melhorar a coagulação dos sólidos e diminuir a carga orgânica nos tratamentos. Compostos químicos já são utilizados como coagulantes nos tratamentos anaeróbios de diferentes efluentes, porém são considerados economicamente inviáveis e com grande potencial de poluição ambiental.

A digestão anaeróbia é o processo pelo qual ocorre a conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, gás sulfídrico, amônia e água por meio de grupos de microrganismos que atuam na ausência de oxigênio. É utilizada para tratamento de águas, para reuso ou descarte e pós tratamento de efluentes, sendo viável para degradar uma gama de resíduos orgânicos, como restos de culturas agrícolas, dejetos animais e humanos, lixo urbano e lodos de ETEs. O processo de conversão de matéria orgânica em biogás pode ser dividido em diversas rotas metabólicas com a atuação de microrganismos com comportamentos fisiológicos diferentes, a saber, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Para que o processo de digestão anaeróbia tenha máxima eficiência para a produção de gás metano é importante conhecer a capacidade que os microrganismos anaeróbios possuem em degradar os compostos orgânicos e transformá-los em biogás. Esses microrganismos estão presentes no lodo que poderá ser utilizado como inóculo na digestão anaeróbia e, são eles que determinarão a eficiência do sistema. Para conhecer melhor esses microrganismos e sua capacidade de degradação pode ser realizado ensaios de atividade metanogênica específica (Ame). Os ensaios de Ame são realizados em laboratório, sob condições controladas, sendo necessário testes para compreender como é o comportamento de determinado inóculo sob diferentes condições. Por se tratar de bactérias produtoras de biogás alguns fatores são determinantes para favorecer a maior eficiência de produção das mesmas, tais como:

temperatura, substrato, nutrientes, volume de headspace, agitação, pH, vedação do recipiente, entre outros.

Para a realização dos testes de Ame não há metodologia padrão definida na literatura, porém conhecer o lodo a ser utilizado como inóculo na digestão anaeróbia é diferencial para os resultados obtidos. Ter maior número de microrganismos capazes de converter matéria orgânica em metano, maior quantidade de nutrientes benéficos a essas bactérias, bem como a capacidade de formação de grânulos do mesmo. Tendo isso, a possibilidade de influenciar positivamente essa conversão com a inserção de um composto natural como o extrato de *Moringa oleifera* se faz interessante, não só pela provável melhora no start-up do reator, mas também pelo suporte nutricional que a mesma pode oferecer.

Diante do exposto, o presente estudo teve o intuito de avaliar se o extrato da semente de *Moringa oleifera* pode dar o suporte nutricional ao processo de digestão anaeróbia, bem como se diferentes concentrações interferem na Ame. Para isso foram realizadas três etapas, sendo a primeira uma revisão de literatura para fazer um levantamento dos métodos utilizados e quais variáveis interferentes no sistema, a segunda para determinar os valores das variáveis interferentes a serem utilizadas e a terceira etapa foi realizada para determinar se a utilização de extrato de *Moringa oleifera* interfere nos valores da Ame e na degradação da matéria orgânica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi verificar se o extrato da semente de *Moringa oleifera* interfere na degradação da matéria orgânica e na atividade metanogênica específica de um lodo anaeróbio.

2.2 Objetivos específicos

Para realizar o objetivo geral foi necessário:

- Revisar a literatura referente a importância da *Moringa oleifera* e sua utilização e interferência na digestão anaeróbia, bem como na Atividade Metanogênica Específica (Ame), afim de determinar o quais variáveis mais interferentes para o processo;
- Determinar os valores de algumas variáveis consideradas de interesse que são fundamentais para a Atividade Metanogênica Específica, para isso foram testados:

fontes de substrato (ácido acético, mix de ácidos acético, propiônico e butírico, meio complexo), nas concentrações de 500, 1000 e 2000 mgO₂ L⁻¹, relação substrato microrganismo de 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 gO₂ gSVT⁻¹, pHs de 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, e agitação de 0, 40, 70 e 100 rpm.

- Investigar a influência da concentração do extrato de semente *M. oleifera* na Ame e nos parâmetros cinéticos de degradação de matéria orgânica, considerando as variáveis já pré definidas.

CAPÍTULO 1: ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA: REVISÃO

Protocolos e variáveis interferentes para a determinação da atividade metanogênica específica: Revisão

Izabela Paiva Martins¹, Gustavo Mockaitis¹

¹ Faculdade de Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Resumo

Os protocolos de procedimento para determinação da atividade metanogênica específica não são padronizados, sendo realizados com diferentes concentrações de fontes de carbono e em diversas condições experimentais. O objetivo deste artigo é apresentar uma revisão de literatura referente aos diferentes métodos de leitura do biogás, a interferência de variáveis como pH, fonte de nutrientes, substrato e concentração e agitação, bem como às diferentes condições experimentais voltadas para a determinação da atividade metanogênica específica para diferentes lodos anaeróbios. O inóculo utilizado em testes de atividade metanogênica específica são de diferentes procedências, sendo assim, possuem diversos microrganismos e diferentes nutrientes que podem favorecer ou prejudicar o processo da digestão anaeróbia. Além disso, a determinação e classificação do biogás produzido pode ser realizada de formas variadas a depender da condição experimental. Por esse motivo a determinação definitiva de um protocolo, seja para condução dos ensaios de atividade metanogênica específica ou para condução dos ensaios, é dificultada, permanecendo na literatura sem um padrão definido.

Palavras-chave: atividade metanogênica específica, digestão anaeróbia, metano.

1 Introdução

A atividade metanogênica específica (Ame) é a máxima capacidade que um lodo anaeróbio possui em converter compostos orgânicos em biogás, sendo dependente de bactérias metanogênicas e de substratos convertidos a metano por essas bactérias (AQUINO et al., 2007; DOLFING; BLOEMEN, 1985). Os ensaios de Ame são realizados por meio de testes laboratoriais, em ambiente controlado, utilizando reatores em batelada. O cálculo é feito medindo a taxa de produção de metano, por unidade de biomassa (SSV ou SVT) e unidade de tempo.

O monitoramento dos microrganismos responsáveis pela produção de metano é importante para determinar a capacidade de tratamento de alguns efluentes, fazendo-se necessária a medição da produção máxima de metano. Ao conhecer a Ame de determinado lodo é possível estabelecer a máxima remoção de DQO da fase líquida, tornando possível determinar a quantidade mínima de lodo a ser mantida no reator para que determinada carga orgânica seja removida (AQUINO et al., 2007; SOUTO et al., 2010).

O teste de Ame pode ser utilizado para quantificar a atividade metanogênica de um lodo, monitorar mudanças de atividade do lodo, estabelecer o grau de degradabilidade de

diversos substratos, avaliar o comportamento de biomassas em diversas situações, avaliar parâmetros cinéticos e determinar toxicidade de compostos químicos presentes em resíduos líquidos e sólidos (CHERNICHARO, 2016).

Os protocolos para determinação da Ame diferem tanto nos procedimentos para incubação do lodo como para a quantificação do metano produzido. Como não há padrão para a determinação da Ame, a International Water Association (IWA) criou um grupo de especialistas com a finalidade de padronizar diversos protocolos, dentre eles a Ame. Porém, até hoje não há consenso de um método único capaz de determinar a atividade metanogênica (AQUINO et al., 2007).

Diante disso, o objetivo deste trabalho é fazer um levantamento bibliográfico sobre os diferentes métodos utilizados para quantificação e qualificação do biogás em ensaios de Ame, bem como apresentar a interferências de diferentes variáveis na atividade metanogênica específica.

2 Método Geral: condução experimental

Ao realizar um ensaio de Ame é necessário ter frascos de vidro (frascos de reação) contendo lodo inóculo, nutrientes e substrato, e os mesmos devem ser mantidos em constante agitação a temperatura mesofílica (30° a 35 °C). A agitação pode interferir diretamente nos valores de Ame obtidos, não sendo recomendado uma agitação magnética muito intensa, pois a biomassa precisa ter contato com o substrato, de modo que haja transferência de produtos e substratos entre os microrganismos (Aquino et al., 2007)

Para analisar a atividade metanogênica de um lodo é necessário que o substrato de alimentação seja suporte de mantimento para as arqueas produtoras de metano. Sabe-se que cerca de 70% do metano produzido como resultado da digestão anaeróbia é oriundo de arqueas acetoclásticas (Jeris; Mccarty, 1965), já os outros 30% provém de microrganismos hidrogenotróficos a partir da redução de dióxido de carbono. Pesquisadores utilizam sais de acetato ou ácido acético como fonte de substrato, mesmo este subestimando em no mínimo 30% a capacidade de produzir metano devido aos microrganismos hidrogenotróficos terem maior taxa de crescimento que os acetoclásticos e, quando presentes em reatores reais, degradam substratos mais complexos gerando hidrogênio e gás carbônico (Aquino et al., 2007).

Com o intuito de avaliar a Ame dos dois grupos de bactérias, é recomendado a utilização de uma mistura de ácidos graxos voláteis, geralmente constituída de acetato, propionato e butirato, na proporção de 100:100:100 g.L⁻¹. O uso dessa mistura de ácidos é importante pois assim o teste, além de avaliar a atividade dos microrganismos metanogênicos,

avalia também a capacidade sintrófica do sistema (Aquino et al., 2007). O ideal para o teste de Ame é que a cinética de degradação se aproxime de uma reação pseudo ordem zero, e para isso é necessário que haja um excesso de substrato e nutriente. O importante é que a concentração de substrato seja superior ao valor de K_s , que para os microrganismos metanogênicos acetocláticos vai de 11 a 421 mg L⁻¹ de acetato, sendo um valor ótimo recomendado o de 2 g L⁻¹ (Aquino et al., 2007), que corrobora com o resultado de Monteggia (1997), que obteve valores máximos de Ame utilizando ácido acético na faixa de 2 a 4 g L⁻¹.

A concentração inicial do inóculo é o que determina a duração do ensaio. Quanto maior a concentração de inóculo, menor é a relação substrato/microrganismos (S/M), fazendo com que o substrato se degrade mais rapidamente. Monteggia obteve valores máximos de Ame utilizando de 2 a 5 gSSV.L⁻¹, e que ao utilizar valores crescentes ou decrescentes de SSV houve uma pequena redução nos valores de Ame, porém, ao utilizar valores maiores de 5 gSSV.L⁻¹ ocorreu redução significativa na duração do ensaio (Monteggia, 1997).

Junto ao inóculo e substrato deve ser utilizado uma solução de nutrientes nos testes de Ame, que deve conter macro e micronutrientes, alcalinidade e agente redutor. Como não há acordo sobre quantidades e nutrientes específicos a serem utilizados, alguns autores utilizam as recomendações já presentes na literatura, geralmente fazendo algumas adaptações com redução ou acréscimos de nutrientes e quantidades (Aquino et al., 2007; Chernicharo, 2016; Monteggia, 1997; Souto et al., 2010). Aquino et al. (2007), realizou uma revisão sobre os principais nutrientes utilizados em ensaios de AME nos anos 80 e 90, sendo elas utilizadas atualmente com adaptações, como a apresentada por Chernicharo (2016) na Tabela 1.

Tabela 1. Solução de nutrientes recomendados para testes de AME

Solução	Nutriente	Concentração (mg L ⁻¹)	Finalidade
1	NaHCO ₃	1.000	Fonte de alcalinidade
	KH ₂ PO ₄	650	Macronutrientes e fonte de alcalinidade
	K ₂ HPO ₄	150	Macronutriente e fonte de alcalinidade
	NH ₄ Cl	500	Macronutriente
	MgCl ₂	100	Macronutriente
	CaCl ₂ .2H ₂ O	100	Macronutriente
	Na ₂ S.7H ₂ O	50	Agente redutor

	Extrato de levedura	50	Fonte de vitaminas
2	FeCl ₃ .6H ₂ O	2,0	Micronutrientes
	ZnCl ₂	0,05	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,03	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,05	
	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,05	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	20	
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,05	
	H ₃ BO ₃	0,01	

Outros autores utilizaram solução nutricional composta de macro e micro nutrientes que pudessem favorecer a produção de metano, sendo essas sempre semelhantes em quantidade e composição como as já apresentadas (LOZANO et al., 2009; MD HUZIR et al., 2019). Porém alguns autores sugerem que não há necessidade de utilizar nutrientes extras dependendo da origem do inóculo, como por exemplo lodo de esgoto sanitário (DOLFING; BLOEMEN, 1985; JAMES; CHERNICHARO; CAMPOS, 1990; PENNA, 1994).

3 Métodos de medição do biogás: Quantificação e qualificação

3.1 Métodos manométricos

Os métodos manométricos tem como princípio medir a variação da pressão exercida sobre um sensor acoplado ao frasco de reação. Dependendo da calibração realizada no equipamento, a medida feita pode determinar a taxa de produção diária tanto da mistura de gases quanto apenas da fração de metano. A vantagem desse método é a possibilidade de acoplar os medidores de pressão a computadores, o que permite a leitura instantânea dos dados, porém o custo para aquisição dos equipamentos é alto.

A princípio essa metodologia foi aplicada utilizando manômetros do respirômetro de Warbug, em processos de degradação aeróbia, com a finalidade de monitorar a captação de oxigênio. Após, James et al. (1990) apresentaram uma adaptação do respirômetro para processos anaeróbios, para monitorar a produção de biogás. Nesse novo processo foi adaptado um frasco com braço lateral, equipado com septo de látex, para que fosse possível a análise qualitativa do biogás produzido.

Posteriormente, Monteggia (1991) realizou um experimento com respirômetro para determinação de Ame no qual continha 8 frascos de reação com capacidade de 1L, os quais possuíam agitadores magnéticos e submersos em banho termostaticado. Para medir o biogás o sistema possuía uma válvula solenoide de 3 vias que era controlada por um medidor de pressão, duas vias para saída e entrada do gás do frasco para o manômetro, e uma via de purga. Com o passar do tempo de ensaio, a pressão era registrada à medida que ia aumentando no frasco e no reservatório de gás, até atingir um limite estipulado. Quando esse limite era atingido, as válvulas de saída e entrada de gás se fechavam e a de purga abria para esvaziar o sistema, para então começar um novo ciclo.

Para métodos manométricos, caso haja uma etapa prévia à medição de pressão para a absorção de dióxido de carbono, não é necessário o uso de cromatógrafo. Nos respirômetros utilizados nos trabalhos já descritos e nos de Chernicharo e Campos e de Ince, Anderson e Kasapgil (1991 e 1995) a leitura de gás carbônico e metano eram obtidas simultaneamente, se fazendo necessário o uso da cromatografia para quantificar o metano produzido.

Um outro método utilizado com o princípio de medição de pressão é uma adaptação do kit Oxitop, utilizado para determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Esse sistema se baseia na redução da pressão parcial de oxigênio no headspace, gerada pelo consumo de oxigênio dissolvido na fase líquida e reposição de oxigênio molecular na fase gasosa, que ocorrem nos processos aeróbios. Com a degradação aeróbia há produção de gás carbônico, sendo necessário que o mesmo seja absorvido antes da medição da pressão, para que a queda de pressão ocasionada pelo consumo de oxigênio seja percebida e quantificada de forma correta (SOUTO et al., 2010).

A absorção de CO₂ nos equipamentos Oxitop é feita por meio de pastilhas de NaOH, que são colocadas de forma suspensa, obrigando os gases a passar antes de chegarem ao transdutor de pressão. Com isso, é possível adaptar o Oxitop para ser utilizado nos ensaios de AME, sendo que seria registrado um aumento de pressão devido a produção de metano e não uma redução devida o consumo de oxigênio (SOUTO et al., 2010).

Em teste de Ame, Souto e colaboradores (2010) analisaram o método Oxitop juntamente com métodos volumétricos para a medição de metano e puderam observar que todos os métodos testados possuem respostas similares. Para a realização do ensaio esses autores utilizaram o modelo Control COM-6 com Oxitop-C, no qual instalaram pastilhas de NaOH em um suporte montado dentro do Oxitop para que o CO₂ fosse absorvido e as leituras de pressão fossem referentes apenas ao metano.

Para o processo manométrico é necessário calibrar o equipamento e determinar a constante de frasco (K – unidade de volume/unidade de pressão), de forma que o volume do biogás (V – unidade de volume) possa ser relacionado com a pressão medida (P – unidade de pressão) por meio da equação (CHERNICHARO, 2016):

$$V = K.P$$

3.2 Métodos Volumétricos

Existem também os métodos volumétricos que se baseiam na determinação do volume de biogás ou metano produzido em um frasco de reação que contenha o lodo a ser testado. Há reportado três metodologias geralmente utilizadas: medição do volume e composição de biogás, medição apenas da composição do biogás e medição direta do volume de metano (AQUINO et al., 2007).

3.2.1 Medição do volume e composição do biogás

O método consiste em utilizar frascos de vidro (tipo penicilina) contendo inóculo, substrato e uma solução nutriente, os quais são mantidos em condições mesofílica de 7 a 20 dias. O teste é finalizado quando a produção acumulada de metano estabiliza, ou seja, é necessário o acompanhamento diário para a verificação do ponto máximo da produção de metano, obtido em um gráfico temporal “volume acumulado” versus “tempo de inoculação”.

A retirada do biogás pode ser realizada diariamente utilizando seringa esmerilhada e sua composição pode ser feita por meio de cromatografia gasosa. O volume produzido de metano é calculado pela multiplicação do volume de biogás pela porcentagem de metano no biogás. Essa porcentagem pode ser determinada por uma curva de calibração construída por meio de injeções, no cromatógrafo gasoso, de gases padrão que contenham diferentes porcentagens de metano, ou por injeções de diferentes volumes de um mesmo gás padrão. Nesse método, após a retirada de biogás para amostragem, o headspace é esvaziado utilizando uma agulha inserida na tampa até que a pressão do frasco se iguale a da atmosfera. Alguns autores utilizaram seringas de vidro com agulhas conectadas por válvula de três vias, e após a retirada de amostra a mesma é analisada por um cromatógrafo gasoso para a análise do biogás (SOUTO et al., 2010). A A_m é determinada no gráfico temporal de produção acumulada de metano pelo coeficiente angular do trecho de maior inclinação. Para obter resultado é necessário conhecer a massa de lodo inoculada e realizar a conversão da produção diária de metano, dada em volume,

para d_{qo}, pois o resultado final é expresso em gDQO_{CH₄}/gSSV.d. Essa transformação pode ser realizada conhecendo o coeficiente estequiométrico de oxidação do metano (AQUINO et al., 2007).

3.2.2 Medição apenas da composição do biogás

A montagem dos frascos e condução do ensaio é realizada de forma semelhante ao método anterior, sendo que a diferença está na leitura do biogás, que é realizada diariamente retirando um volume fixo de dentro do frasco de reação, e determinando a quantidade de metano por cromatografia gasosa. Esse método tem como vantagem a dispensa da utilização de seringas de vidro e a medição do volume de biogás, porém o frasco de reação trabalha com pressões elevadas, o que pode ocasionar perda de biogás.

Como apenas uma pequena amostra de biogás é retirada diariamente e não há o esvaziamento do headspace, pode acontecer de haver uma maior quantidade de metano presente na fase líquida, mesmo esse gás sendo pouco solúvel. Com isso, há a necessidade de calcular a solubilidade do metano, o que pode ser feito utilizando a Lei de Henry:

$$X_1 = K \cdot P_g$$

onde: X_1 é a concentração de metano dissolvida (mol.L^{-1}); K é a constante da Lei de Henry (para CH_4 a 25°C , $K = 1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$); e P_g é a pressão do metano (atm) (AQUINO et al., 2007).

Para a curva de calibração deve haver o cuidado de se coletar exatamente sempre o mesmo volume, para que não haja erros. Para sua construção deve-se relacionar o número de moles de metano no headspace com a área sob o pico de metano separado e detectado por cromatografia. E como descrito anteriormente, para a curva pode ser injetado diferentes quantidades de um gás contendo porcentagem fixa de metano, ou volumes fixos de gases contendo diferentes porcentagens de metano. Conhecendo o número de moles, por meio da curva de calibração é possível determinar o volume fixo de amostra a ser injetado. Com isso, pode-se saber a produção diária de metano (mLCH_4/d), assim como a produção acumulada ($\text{gDQO}_{\text{CH}_4}$) e o valor da AME pode ser calculado como descrito anteriormente (AQUINO et al., 2007).

3.2.3 Medição direta do volume de metano

Nesse método há a necessidade de lavar o biogás com uma solução de soda para haver a absorção do CO_2 . Não é necessário a utilização de cromatógrafo para determinar a

composição do biogás, o que o torna uma alternativa de baixo custo para qualquer laboratório e ETEs pequenas e com pouca infraestrutura.

O volume de metano produzido pode ser determinado medindo-se o volume do biogás lavado ou o da solução de hidróxido deslocado pelo gás lavado. No momento da leitura, no Aparato I, pode-se conectar, por meio de um sistema de agulhas e mangueira de látex (impermeável a gás), o frasco de reação (ou incubação) ao frasco de NaOH, tornando possível que a agulha da seringa esmerilhada no septo do frasco de NaOH retire a pressão do frasco de reação. O gás que entra no frasco de NaOH fica abaixo do nível da solução fazendo com que o gás medido seja apenas metano. Já no Aparato II, ao utilizar o sistema de agulhas e mangueira e ocorrer a despressurização do frasco de reação, há a expulsão da solução de soda, que corresponde ao volume de metano produzido, tornando possível conhecer o volume ou peso de metano por meio da quantidade de soda expulsa. A vantagem do Aparato I é a não necessidade de reposição diária de solução de NaOH e a do Aparato II é a não utilização de seringas esmerilhadeiras (AQUINO et al., 2007).

Alguns autores, utilizando o método de lavagem de gás em solução alcalina, utilizou NaOH 0,1M para absorver o dióxido de carbono, enquanto o volume restante se daria principalmente por metano (SOUTO et al., 2010). Esses mesmos autores compararam o método manométrico utilizando o sistema Oxitop e o método volumétrico com caracterização do biogás em cromatógrafo e observaram que não há diferença significativa entre os três métodos, sendo possível realizar o teste de Ame em diferentes infraestruturas laboratoriais.

Conhecendo o volume diário de metano produzido é possível obter a produção acumulada ($\text{gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{d}$) como já descrito anteriormente. O valor de Ame, da mesma forma, pode ser calculado conhecendo-se a quantidade de inóculo utilizada e a taxa máxima de produção de metano obtida no trecho de maior inclinação e que corresponda a uma utilização de pelo menos 50% do substrato adicionado.

Dentre os diferentes métodos de medição do biogás, é possível perceber que alguns se sobressaem aos outros em relação a custo, facilidade e condição para execução. Com isso, a Tabela 2 traz uma lista de vantagens e desvantagens com a finalidade de, resumidamente, comparar os diferentes métodos afim de facilitar a condução dos ensaios.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens dos métodos de medição do biogás

Métodos	Vantagens	Desvantagens
---------	-----------	--------------

Manométrico	Acoplar os medidores de pressão a computadores e automatizar as leituras	Custo para aquisição e manutenção dos equipamentos
Manométrico com sistema Oxitop	Fácil utilização do sistema para leitura da produção	Elevado custo na aquisição dos equipamentos do sistema
Medição do volume e composição do biogás	Maior precisão na leitura do volume e quantificação do biogás	As leituras devem ser feitas diariamente
Medição da composição do biogás	Dispensa a medição do volume do biogás e o uso de seringas de vidro	A pressão do frasco de reação é muito elevada, podendo haver perda do biogás
Medição direta do volume de metano	Dispensa o uso de cromatógrafo. Pode ser implementado em laboratório com baixa infraestrutura	Não é possível quantificar o biogás, sendo possível apenas saber seu volume

4 Revisão de literatura: variáveis interferentes

A Ame é muito utilizada como indicador da atividade microbiana durante a digestão anaeróbia, sendo calculada pela divisão da taxa máxima de produção de metano pela biomassa utilizada (SORENSEN; AHRING, 1993). Ensaios de Ame tem sido confundido com ensaios de potencial biomenatogênico (BMP), que tem a finalidade de avaliar o potencial de resíduos sólidos e suas associações, em produzir metano. Owen et al. (1979) foram os primeiros a desenvolverem ensaios com essa finalidade, sendo posteriormente melhorado por Angelidaki et al. (2009). Assim como nos ensaios de Ame, em ensaios de BMP não existe um método ou protocolo de execução estabelecido como padrão, pois envolve diferentes substratos orgânicos e microrganismos, conversores da matéria orgânica, método de condução dos ensaios, leitura e determinação dos parâmetros cinéticos.

A maioria dos trabalhos envolvendo ensaios de Ame tem a finalidade de avaliar as fontes de substrato e suas dosagens, a necessidade de utilização de solução nutriente e a agitação. A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos realizados nos últimos anos com o intuito de analisar a Ame de diferentes lodos em condições variadas de ensaio. Algo em comum entre os trabalhos que analisaram os parâmetros cinéticos, apresentados nessa tabela, é o modelo utilizado para a determinação dos parâmetros cinéticos de produção do biogás, o de Gompertz

ou Gompertz modificado. Esse modelo se adequa ao comportamento da produção de biogás, assumindo que a atividade microbiana diminui com o tempo de incubação.

Tabela 3. Revisão de diferentes protocolos, substratos e inóculo para determinação da atividade metanogênica específica

Referência	Variáveis										
	Inóculo	Substrato	Nutrientes	Temperatura	Agitação	Headspace	N2	Método de medição do biogás*	Modelo	Controle	pH
(SOUTO et al., 2010)	Esgoto doméstico tratado em reator UASB	Esgoto bruto, acetato, glicose e formiato	Sim	30°	Sim – 200rpm	-	N ₂ +CO ₂ (70:30v/v)	1, 2 e 3	-	Sim	-
(MD HUZIR et al., 2019)	Digestor anaeróbico e filtro anaeróbico	Acetato + níveis crescentes de Na+ (0,05, 0,5 e 5 gNa+/L)	Sim	30°	Sim – Mecânica	-	-	2	-	-	-
(KAYRANLI; UGURLU, 2012)	Águas residuais de baixa resistência e a baixas temperaturas (1,293 – 1,324 gVSS)	Ácido acético (250 mgCOD/L)	-	10, 15 e 20°	-	-	-	2	Gompertz (JAITALEE; DARARAT; CHAVALPARI T, 2010)	-	7,0
(LIU et al., 2016)	Lodos com alto teor de sólidos (15,7% TS) e lodo com baixo teor de sólidos (5,7% TS)	Acetato, butirato, propionato de sódio, glicose, celulose microcristalina,	Sim	35°	Sim	-	Sim	2	Gompertz (ANGELIDAKI et al., 2009)	Sim	-

		hidrogênio, gás carbônico									
(ZHOU et al., 2019)	Lodo seco de tratamento anaeróbio de suíno (15,68% VS), lodo úmido de digestão anaeróbia (0,84% VS)	Glicose, acetato, butirato, propionato, combinado de H ₂ e CO ₂	-	35°	Sim	-	Sim	-	Gompertz	-	7,7 – 7,2
(LE HYARIC et al., 2011)	Resíduo sólido municipal (48,4% VS)	Propionato (1, 2, 5 e 10gDQO/kg)	Sim	35°	-	-	Sim	3	Gompertz	Sim	-
(SCHNEIDER et al., 2013)	Lodo de indústria têxtil (aeróbio) e lodo de indústria alimentícia(anaeróbio) (2,5gSSV/L)	Mix de ácidos: Hac, HPr, Hbut	Sim	33°	Sim-100rpm	-	Sim	2	-	-	7,0
(LEE; KIM; HWANG, 2021)	Lodo alimentício e lodo de esgoto (5g VSS/L)	Acetato de amônio e de sódio (3 e 6g COD/L)	-	35 – 40°C	-	-	N ₂ +CO ₂ (80:20 v/v)	1	Gompertz (LEE; HWANG, 2019; ZWIETERING et al., 1990)	-	7,5

*1: Método volumétrico com caracterização do biogás por cromatografia; 2: Método volumétrico com deslocamento de líquido e lavagem do biogás; 3: Método manométrico

Souto et al. (2010) realizaram ensaios a fim de comparar os métodos de obtenção e leitura de biogás assim como diferentes fontes e concentração de substrato. Observaram que o acetato em doses próximas a $2\text{gO}_2\text{ L}^{-1}$ faz com que os valores de Ame sejam maiores, os diferentes métodos utilizados para obtenção e determinação do biogás não diferem entre si e, quando utilizado esgoto bruto como substrato, não há necessidade de adição de solução nutriente.

Kayranli e Ugurlu (2012) realizaram um ensaio de Ame para analisar a produção de metano com um reator ASBR e ao comparar seus resultados com outros trabalhos (KAYRANLI; UGURLU, 2011; SOTO; MÉNDEZ; LEMA, 1993), concluíram que a Ame depende das características do lodo, tipo de substrato, condições ambientais e procedimento de ensaio.

Ao realizar um ensaio de Ame é recomendado conduzir frascos branco (ensaio controle) para que as condições da condução da pesquisa sejam testadas. A finalidade da utilização dos frascos branco é eliminar provável influência de substâncias orgânicas biodegradáveis residuais no inóculo e na atividade endógena (BODKHE, 2008; SOUTO et al., 2010; ZHOU et al., 2019).

3.1 Medição do biogás

Como já relatado, há diferentes métodos para avaliar a produção de biogás em ensaios de Ame. Em pesquisa realizada, com a finalidade de comparar os métodos existentes, Souto et.al (2010) utilizaram os métodos volumétricos com caracterização de biogás por cromatografia e com lavagem do biogás em solução alcalina, e o método manométrico com sistema Oxi-top, e observaram que não houve diferença significativa entre as metodologias testadas. Também puderam comprovar a eficiência do sistema Oxi-top ao observar ausência de dióxido de carbono no biogás ao final dos testes.

Assim como as metodologias de condução dos ensaios de Ame não são definidas, o uso de modelo para determinar os parâmetros de avaliação dos resultados também não foi definido. Alguns autores utilizam o modelo de Gompertz (ANGELIDAKI et al., 2009) ou Gompertz modificado (LAY; LI; NOIKE, 1998), que determina parâmetros de produção acumulada de metano e tempo da fase lag, enquanto outros utilizam apenas os valores da própria Ame, a qual é calculada utilizando a produção máxima de metano e quantidade de biomassa (MILÁN et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2013; SOUTO et al., 2010; ZHOU et al., 2019).

3.2 Solução nutriente

A utilização adicional de nutrientes à solução em ensaios de Ame também gera contradições. Alguns autores não mencionam utilizar solução nutriente para complementar o meio (ANGELIDAKI et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2015), outros adicionam para evitar deficiência e beneficiar a produção de metano (LAKANIEMI; TUOVINEN; PUHAKKA, 2013; MILÁN et al., 2003). Entretanto, há pesquisas que indicam necessidade de solução nutricional dependendo do substrato utilizado, como no caso da glicose ou do esgoto doméstico (LE HYARIC et al., 2011; SOUTO et al., 2010; ZHOU et al., 2019). Souto et al. (2010) notaram que os valores de Ame foram maiores quando houve adição de extrato de levedura à solução nutricional, sendo observado que os menores valores foram obtidos quando não foi adicionado nenhum tipo de nutriente extra. Soto et al. (1993) recomenda que não seja utilizado nenhum tipo de nutriente juntamente ao meio, para que não haja limitação de crescimento microbiano ampliando assim o período de medição.

3.2 Substratos e Inóculo

Ao analisar diferentes substratos Souto et al. (2010) observaram que os maiores valores de Ame foram obtidos utilizando acetato como substrato, seguido de glicose, fomiato e esgoto bruto, sendo que as concentrações ótimas de acetato foram de 0,5 e 2,0 g/L. Ainda notaram que o acetato, apesar de elevar um pouco os valores de Ame, tem pouca influência quando há a adição de extrato de levedura ao meio, porém para a glicose é benéfico, aumentando os valores de Ame. Concluíram que ao utilizar esgoto bruto como substrato, o uso de solução nutriente não interferiu nos resultados, o que confirma que esgoto bruto já possui em sua composição os nutrientes necessários para o desenvolvimento das archeas metanogênicas (INCE; ANDERSON; KASAPGIL, 1995; LOZANO et al., 2009; PENNA, 1994). A utilização da glicose e outros substratos complexos é recomendada, com a finalidade de avaliar o desempenho do consórcio microbiano presente no inóculo, pois esses são alimentos de microrganismos fermentativos, sintróficos e produtores de metano (AQUINO et al., 2007).

Um outro ensaio utilizou como substrato glicose, acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio e um combinado de H₂ com CO₂ (ZHOU et al., 2019). Como inóculo, os pesquisadores, utilizaram lodo seco de um tratamento anaeróbio de suíno e lodo úmido de uma digestão anaeróbia. O rendimento de metano nos ensaios do lodo seco, tendo como substrato acetato, propionato e butirato, foi menor que nos ensaios com

lodo úmido, enquanto a produção de metano tendo glicose e H_2/CO_2 foi maior no inóculo seco. Quanto maior o valor de metano acumulado, maior foi a conversão de metano e taxa de utilização de substratos. O ácido acético é utilizado diretamente por microrganismos metanogênicos, enquanto que um rendimento inferior do propionato e butirato pode ser devido a ineficiente utilização de hidrogênio liberado. Com glicose e H_2/CO_2 o rendimento foi menor ainda, isso pode ser consequência do metabolismo intrincado da glicose e da transferência e disponibilidade para os metanogênicos limitado de H_2 . Nos ensaios conduzidos com acetato e lodo úmido os valores de Ame foram os mais altos, já para lodo seco, os maiores valores foram alcançados quando utilizado H_2/CO_2 como substrato.

Com inóculos de baixo e alto teor de sólidos, Lui et. al (2016) realizaram ensaios de Ame e avaliaram a produção de metano tendo como substratos: acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio, glicose, celulose microcristalina, hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2). Observaram que a produção de metano para propionato, butirato e acetato foram as mais elevadas, sendo os valores muito próximos. Para celulose e glicose, a produção acumulada de metano foi relativamente baixa, devido aos complexos processos de degradação desses elementos. Para os substratos gasosos, a produção também foi baixa, devido à dificuldade da transferência gás-liquido. Concluíram também que a taxa de reação quando há um alto teor de sólidos é mais lenta.

Já Le Hyarc et.al (2011) analisaram a influência do teor de umidade, de um digerido de resíduo sólido urbano pré-tratado e da concentração de propionato na produção de metano. O propionato, adicionado em duas etapas, foi utilizado como substrato para medir a atividade acetogênica e metanogênica, sendo analisado nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 gDQO/kg biomassa. Observaram que quanto maior a concentração de substrato adicionada na primeira dose, maior foi a Ame, sendo que em doses baixas de 1 e 2 gDQO/kg a produção de metano associada a quantidade de substrato adicionada foi próxima da atividade endógena do lodo, observada nos ensaios controle. O potencial máximo de metano foi atingido mais rápido na concentração de 5 gDQO/kg quando comparado com a concentração de 10 gDQO/kg. Notaram que ao adicionar a segunda dose de propionato houve uma diminuição da atividade biológica do ensaio, sem haver explicação para tal fenômeno.

Outro estudo analisou a viabilidade de utilização de inóculos salinos, ou com quantidades consideráveis de sódio (MD HUZIR et al., 2019). Para isso os pesquisadores utilizaram lodos provenientes de digestor anaeróbio e de filtro anaeróbio. Eles notaram

que os valores de Ame são maiores para inóculo de filtro anaeróbio quando comparado com inóculo de digestor anaeróbio, independente da quantidade de sódio presente. Essa diferença de Ame entre os lodos pode ser justificada pelo uso de meio poroso no filtro anaeróbio, formando um biofilme, o que ajuda na aderência do lodo, produzindo assim maior Ame, enquanto que no digestor anaeróbio o lodo fica em suspensão (ARNAIZ; GUTIERREZ; LEBRATO, 2006; BODKHE, 2008; CHEN; SUN; CHUNG, 2007). Observaram que quanto maior a dosagem de Na^+ menores são os valores de AME, sendo que o grau de inibição é maior para o lodo de filtro anaeróbio e a adaptação das bactérias metanogênicas varia em diferentes níveis de sódio (LAKANIEMI; TUOVINEN; PUHAKKA, 2013; MD HUZIR et al., 2019).

Também foi analisado o impacto ocasionado na Ame pela inibição por sódio e amônia (LEE; KIM; HWANG, 2021). Para isso, os pesquisadores utilizaram lodo alimentício e de esgoto sanitário como inóculo e aceto de sódio e de amônia como substrato. Foram testadas condições sem inibição, com inibição por sódio ou amônia e uma inibição combinando sódio e amônia. Observaram que o sódio e a amônia tem efeito de inibição na fase lag e na Ame, tanto individualmente quanto em combinação, porém a inibição quando combinado os dois elementos é maior. O inóculo de lodo alimentício sofreu menor inibição que o de lodo de esgoto nos tratamentos inibitórios tanto de sódio quanto de amônia. Os valores de 4 g/L de sódio e 6,5 NAT/L de amônia estenderam a fase lag e reduziu a Ame em ambos inóculos, porém não houve diminuição na produção total de CH_4 . A comunidade metanogênica dos inóculos foram diferentes, sendo que o grupo de metanogênicas acetoclásticas foi muito inferior no lodo alimentício quando comparado com o lodo de esgoto. A determinação da fase lag está diretamente relacionada ao tempo necessário antes do início da recuperação, após a interrupção da digestão anaeróbia por condições inibitórias.

4 Conclusão

Os ensaios de atividade metanogênica específica continuam a ser executados sem método padrão definido. No geral, os ensaios são realizados em condição mesofílica e é recomendado agitação dos frascos, porém é amplo a possibilidade de utilização de solução nutriente, substrato e inóculo.

O ideal é que houvesse uma padronização da metodologia, porém, a dificuldade em realizar essa padronização está relacionada às grandes opções de substratos e inóculos que podem ser utilizados. A depender do inóculo deve haver um

preparo prévio antes de iniciar os ensaios, como a aclimatação. Dependendo do substrato é necessário utilizar solução nutriente enriquecida de diferentes formas.

Vale ressaltar que os ensaios são utilizados como forma de avaliar os potenciais de diferentes inóculos e substratos, como ferramenta para a obtenção de parâmetros cinéticos visando o desenvolvimento de protótipos de biorreatores em escala laboratorial e piloto, ou como método para otimização de processos pela triagem das variáveis ambientais (diferenciar de variáveis de processo) mais relevantes na produção do biogás, seja ele enriquecido com metano ou com hidrogênio.

5 Referências

ANGELIDAKI, I. et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 5, p. 927–934, 2009.

AQUINO, S. F. et al. Methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic sludges. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.

ARNAIZ, C.; GUTIERREZ, J. C.; LEBRATO, J. Support material selection for anaerobic fluidized bed reactors by phospholipid analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 240–245, jan. 2006.

BODKHE, S. Development of an improved anaerobic filter for municipal wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 222–226, jan. 2008.

CHEN, S.; SUN, D.; CHUNG, J. S. Anaerobic treatment of highly concentrated aniline wastewater using packed-bed biofilm reactor. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1666–1670, dez. 2007.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016.

CHERNICHARO, C. A. L.; CAMPOS, C. M. M. A NEW METHODOLOGY TO EVALUATE THE BEHAVIOUR OF ANAEROBIC SLUDGE EXPOSED TO POTENTIALLY INHIBITORY COMPOUNDS. **Waf. Sci. Tech**, v. 24, n. 12, p. 201–210, 1991.

DOLFING, J.; BLOEMEN, W. G. B. M. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, p. 1–12, 1985.

INCE, O.; ANDERSON, G. K.; KASAPGIL, B. **CONTROL OF ORGANIC LOADING RATE USING THE SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY TEST DURING START-UP OF AN ANAEROBIC DIGESTION SYSTEM** *Wat. Res.* [s.l: s.n.].

JAITALEE, L.; DARARAT, S.; CHAVALPARIT, O. Bio-hydrogen Production Potential from Market Waste Bio-hydrogen Production Potential from Market Waste EnvironmentAsia. **Environment Asia**, v. 3, n. 2, p. 115–122, 2010.

JAMES, A.; CHERNICHARO, C. A. L.; CAMPOS, C. M. M. THE DEVELOPMENT OF A NEW METHODOLOGY FOR THE ASSESSMENT OF SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY. **Wat, Res**, v. 24, n. 7, p. 813–825, 1990.

JIMÉNEZ, J. et al. Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 703–714, 1 jan. 2015.

KAYRANLI, B.; UGURLU, A. Effects of temperature and biomass concentration on the performance of anaerobic sequencing batch reactor treating low strength wastewater. **Desalination**, v. 278, n. 1–3, p. 77–83, 1 set. 2011.

KAYRANLI, B.; UGURLU, A. **Assessment of Methanogenic Activity and Kinetics of Anaerobic Granular Sludge.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/257298150>>.

LAKANIEMI, A. M.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers - A review. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 222–231, 2013.

LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. DEVELOPMENTS OF BACTERIAL POPULATION AND METHANOGENIC ACTIVITY IN A LABORATORY-SCALE LANDFILL BIOREACTOR. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3673–3679, 1998.

LE HYARIC, R. et al. Influence of substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 822–827, 2011.

LEE, J.; HWANG, S. Single and combined inhibition of *Methanosaeta concilii* by ammonia, sodium ion and hydrogen sulfide. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 401–411, 1 jun. 2019.

LEE, J.; KIM, E.; HWANG, S. Effects of inhibitions by sodium ion and ammonia and different inocula on acetate-utilizing methanogenesis: Methanogenic activity and

succession of methanogens. **Bioresource Technology**, v. 334, n. January, p. 125202, 2021.

LIU, C. et al. Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 96–100, 15 maio 2016.

LOZANO, C. J. S. et al. Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 704–711, fev. 2009.

MD HUZIR, N. et al. Effect of Specific Methanogenic Activity (SMA) of Anaerobic Sludge under High Salinity. **Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology Journal homepage**, v. 16, p. 35–40, 2019.

MILÁN, Z. et al. Effect of natural and modified zeolite addition on anaerobic digestion of piggery waste. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 263–269, 2003.

MONTEGGIA, L. **The use of a specific methanogenic activity for controlling anaerobic reactors**. [s.l.] University of Newcastle upon Tyne, 1991.

OLINTO MONTEGGIA, L. **PROPOSTA DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO “ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA.”** 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...Foz do Iguaçu: 1997.**

OWEN, W. F. et al. BIOASSAY FOR MONITORING BIOCHEMICAL METHANE POTENTIAL AND ANAEROBIC TOXICITY. **Water Research**, v. 13, p. 485–492, 1979.

PENNA, J. A. Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica. **Universidade São Paulo Escola De Engenharia De São Carlos**, p. 182, 1994.

SCHNEIDER, D. et al. Atividade metanogênica específica (AME) de lodos industriais provenientes do tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. **Revista Ambiente e Água**, v. 8, n. 2, p. 135–145, 2013.

SORENSEN, A. H.; AHRING, B. K. **Applied Microbiology Biotechnology Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass** **Appl Microbiol Biotechnol**. [s.l.: s.n.].

SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. METHANOGENIC AND NON-METHANOGENIC ACTIVITY TESTS. THEORETICAL BASIS AND EXPERIMENTAL SET UP. **Water Research**, v. 27, n. 8, p. 1361–1376, 1993.

SOUTO, T. F. et al. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. **Biodegradation**, v. 21, n. 3, p. 411–424, jun. 2010.

ZHOU, M. et al. Methanogenic activity and microbial communities characteristics in dry and wet anaerobic digestion sludges from swine manure. **Biochemical Engineering Journal**, v. 152, 15 dez. 2019.

ZWIETERING, M. H. et al. **Modeling of the Bacterial Growth Curve** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. [s.l: s.n.].

CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DO SUBSTRATO E CONCENTRAÇÃO, RELAÇÃO SUBSTRATO MICRORGANISMO, PH E AGITAÇÃO EM ENSAIOS DE ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA DE LODO ANAERÓBIO

Determinação do substrato e concentração, relação substrato/microrganismo, pH e agitação em ensaios de atividade metanogênica específica de lodo anaeróbio

Izabela Paiva Martins¹, Maria Paula Cardeal Volpi¹, Gustavo Mockaitis¹

¹ Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Resumo

Os ensaios de atividade metanogênica específica são realizados para determinar a capacidade de conversão de compostos orgânicos em biogás que os microrganismos presentes em um inóculo possuem. Porém sabe-se que algumas variáveis afetam diretamente esse potencial de produção. O objetivo deste estudo foi determinar os melhores valores de algumas variáveis de interesse em estudos de atividade metanogênica específica, tais como: fonte de carbono e sua concentração, relação substrato/microrganismo, pH e agitação. Os ensaios foram conduzidos em frascos de penicilina, sendo que para cada variável foi predeterminado um valor fixo para iniciar. Posteriormente, para cada variável determinada foi sendo utilizado os valores descobertos para as variáveis subsequentes. Obteve-se que melhor fonte de carbono é ácido acético na concentração de 1000mgO₂ L⁻¹, relação substrato/microrganismo de 0,5 mgO₂ mgSVT⁻¹, pH 8 e agitação de 40rpm.

Palavras-chave: digestão anaeróbia, ensaios de Ame, metano.

1 Introdução

A digestão anaeróbia é um processo bioquímico que ocorre na ausência de oxigênio por meio da decomposição bacteriana de compostos orgânicos particulados complexos para compostos dissolvidos mais simples. Esse processo resulta na formação de biogás composto principalmente por metano e dióxido de carbônico, a depender da microbiota do inóculo e da rota predominante de degradação. A produção de metano por meio da digestão anaeróbia depende de fatores como origem do inóculo, relação substrato/microrganismo, temperatura, entre outros (CHERNICHARO, 2016; HIMANSHU et al., 2017).

A atividade metanogênica específica (Ame) é utilizada para caracterizar bioquimicamente os microrganismos presente em um inóculo, com o objetivo de potencializar a produção máxima de biogás, utilizando concentrações suficientes de substrato (SINBUATHONG et al., 2007). O ensaio de Ame, além de ser simples, é importante para se conhecer melhor o processo de start up de um reator, seu controle e operação, por meio do processo de digestão anaeróbia. O potencial de produção de metano pode ser expresso por massa seca de substrato, quando a digestão é sólida, ou dco

de massa de substrato, quando a digestão é líquida (DECHRUGSA; KANTACHOTE; CHAIPRAPAT, 2013).

O teste de Ame é facilmente confundido com ensaios de potencial biometanogênico (BMP), sendo este utilizado para determinar a capacidade final de produção de metano de um inóculo sólido ou associação entre sólido e líquido, tendo a finalidade de verificar se há melhorias no equilíbrio de nutrientes causado pelo efeito de sinergia. Jimenez (2015) ao realizar um ensaio de codigestão de esterco suíno com palha de arroz, utilizando argila como agente de adsorção, em ambiente mesofílico e termofílico fizeram essa confusão entre os ensaios, ao realizarem os mesmos, nomearam de Ame apesar de se tratar de ensaios de BMP. Ao final, observaram que para ambas condições a adição da palha de arroz não interferiu no resultado final, porém em condições termofílicas a interação entre palha e argila fizeram com que obtivessem menores valores de conversão.

O inóculo a ser utilizado no processo de digestão anaeróbia é de suma importância para o melhor resultado no processo. Os inóculos utilizados com a finalidade de produção de metano podem vir de diferentes fontes, sendo que o ensaio de Ame deve ser realizado com a finalidade de determinar a quantidade e qual o mais viável a ser utilizado. Jijai et. al (2014) realizaram teste de Ame com inóculos provenientes de diferentes fontes, com o objetivo de analisar a influência do tamanho do grânulo na atividade metanogênica do lodo, e perceberam que quanto maior o grânulo maiores foram os valores de Ame.

Existe uma divergência quanto a padronização do substrato a ser utilizado para um melhor aproveitamento do inóculo e maior potencial de produção de metano. Há ensaios que utilizam glicose, composto de ácidos orgânicos (acético, propiônico e butírico), ácidos orgânicos isolados e apenas ácido acético, já que o mesmo é precursor da produção de metano (AQUINO et al., 2007; WANG et al., 2009). Souto et al. (2010) concluíram que dosagens ótimas, quando se utiliza apenas acetato como substrato, varia de 0,5 a 3,0 gDQO L⁻¹, sendo que valores mais altos foi associado com inibição de lodo. Já Wang et al. (WANG et al., 2009) observaram que ao utilizar etanol, ácidos acético, propiônico e butírico utilizados em concentrações de 1600, 1600, 300 e 1800 mg L⁻¹, respectivamente, obtém-se o máximo de rendimento acumulado de metano e a máxima concentração de bactérias metanogênicas.

Outro fator relevante ao que se refere os ensaios de Ame é a relação substrato/microrganismo (S/M), pois definida a quantidade ideal de inóculo e substrato a

ser utilizada, é essa relação que vai garantir que essas quantias sejam preservadas. Souto et al. (2010) definiram que relação S/M variando de 0,125 a 0,750 gDQO/gSV são as mais influentes em teste de Ame. Esses mesmos autores observaram que a utilização de solução nutriente complementada de levedura beneficia os valores de Ame quando utilizados substratos simples e que o inóculo sendo proveniente de esgoto bruto não há necessidade de acrescentar nutriente a mistura.

Diante do contexto apresentado o presente estudo teve como objetivo realizar a avaliação da Ame para padronizar as melhores condições operacionais, considerando testar diferentes substratos do que usualmente é feito (mix de ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico), acrescentando um meio complexo como substrato e também apenas ácido acético. Além disso, foram testados outros parâmetros operacionais como relação substrato microrganismo, pH e agitação.

2 Materiais e métodos

2.1 Substrato e inóculo

Como substratos foram utilizados diferentes meios de ácidos orgânicos: ácido acético (HAc), uma mistura contendo ácidos acético, propiônico (HPr) e butírico (HBt) (AQUINO et al., 2007) e um meio complexo composto por sacarose: 35 mg L⁻¹, amido: 114 mg L⁻¹, celulose: 34 mg L⁻¹, extrato de carne: 208 mg L⁻¹, óleo de soja: 51 mg L⁻¹ e três gotas de detergente para emulsionar o óleo (MOCKAITIS et al., 2010).

Um meio nutriente foi utilizado dentro de cada reator na quantidade de 2,5mL de cada solução (A, B, C e D), com a finalidade de enriquecimento nutricional do ambiente bacteriano (DEL NERY, 1987), juntamente com 11 mL de uma solução de vitaminas (WOLLIN; WOLLIN; WOLPE, 1963). A composição das soluções é descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Solução nutriente e vitaminas utilizadas

Solução Stock	Nutriente	Concentração na solução stock (mg L ⁻¹)
A	NiSO ₄ . 6H ₂ O	0,5
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,5
	FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ . 2H ₂ O	0,04

B	CaCl ₂ · 6H ₂ O	2,06
C	SeO ₂	0,14
	KH ₂ PO ₄	5,36
D	K ₂ HPO ₄	1,3
	Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	2,76
Vitaminas	Biotina	2,0
	Ácido fólico	2,0
	Cloridrato de piridoxina	1,0
	Riboflavina	5,0
	Tiamina	5,0
	Ácido nicótico	5,0
	Ácido pantotênico	5,0
	B ₁₂	1,0
	Ácido p- aminobenzóico	5,0
	Ácido p- aminobenzóico	5,0

Foi utilizado um inóculo proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) utilizado no tratamento de água residuária industrial de abatedouro de aves da empresa Avícola Ideal, situada no município de Pereiras – SP. Foi realizada a análise de série de sólidos (método 2540) de acordo com o standard methods for the examination of water and wastewater (APHA, 2012a) sendo o teor de sólidos voláteis totais (SVT) de $42,3 \pm 3,8$ g SVT L⁻¹. Esse inóculo foi mantido sob refrigeração e retirado 2 horas antes do uso. Ele foi o último a ser adicionado nos frascos, já que desde a sua introdução era dado início na contagem do experimento.

2.2 Atividade Metanogênica Específica

O ensaio de atividade metanogênica específica (Ame) foi conduzido em 4 etapas (Figura 1), a fim de investigar variáveis de interesse que podem interferir no desempenho do teste de Ame e nos parâmetros cinéticos aparente de degradação da

matéria orgânica (em termos de DQO), sendo elas: o tipo e concentração de substrato (Fase Ia), a relação substrato/microrganismo (S/M) (Fase Ib), o pH (Fase Ic) e a agitação (Fase Id).

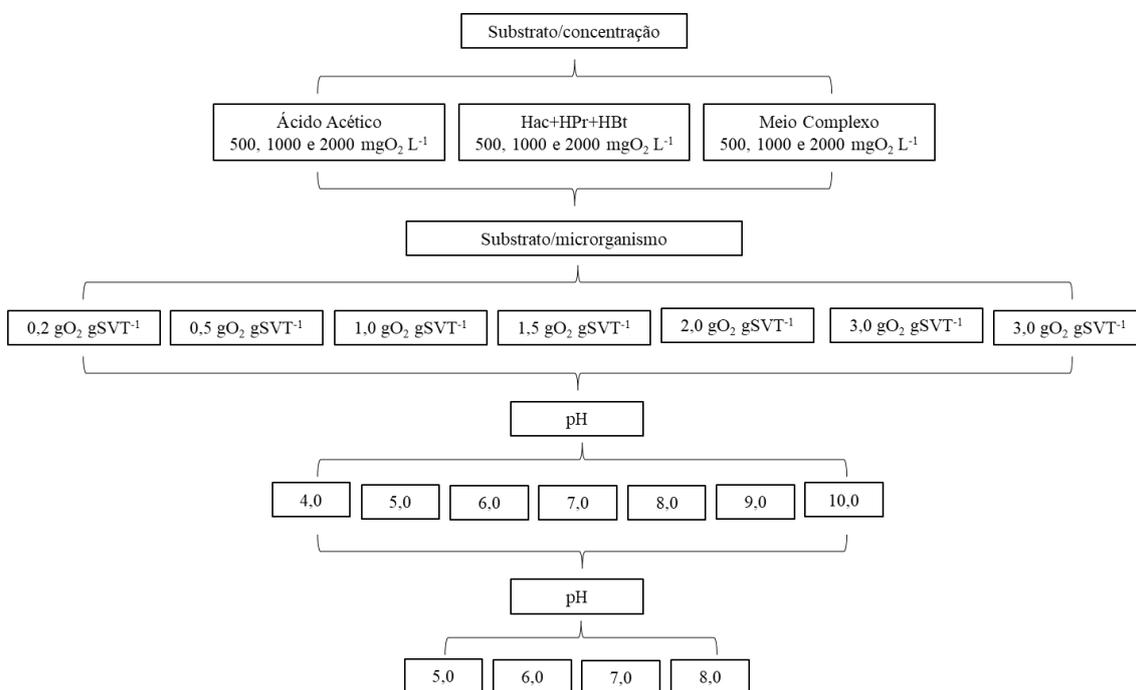


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental.

A avaliação ocorreu de forma individual, tal que cada Fase avaliou apenas um fator mantendo os outros constantes. À medida que cada Fase foi sendo realizada os valores já estudados foram sendo fixados para as Fases subsequentes. Para a definição de cada variável foi levado em consideração uma operação estável e de maior valor de Ame. A Tabela 2 mostra o delineamento experimental de cada etapa e os parâmetros que foram mantidos constantes em cada um dos ensaios. A relação S/M definida utilizou os melhores valores obtidos para a maximização da Ame (PENNA, 1994; STEIL, 2007). O valor de pH inicial está de acordo com as observações de Speece (SPEECE, 1996) para um sistema operando de maneira estável. O valor da agitação foi arbitrado de maneira a promover o máximo de homogeneidade possível sem afetar a integridade do grânulo anaeróbio.

Tabela 2 – Delineamento do experimento para os testes de AME.

Fase	Parâmetros constantes			
	Tipo e concentração de substrato	Relação S/M	pH	Agitação

Ia: Tipo e concentração do substrato	Teste	0,25 gO ₂ gSVT ⁻¹	7,5	100 rpm
Ib: Relação S/M	Definido na Fase Ia	Teste	7,5	100 rpm
Ic: pH	Definido na Fase Ia	Definido na Fase Ib	Teste	100 rpm
Id: Agitação	Definido na Fase Ia	Definido na Fase Ib	Definido na Fase Ic	Teste

Todas as Fases foram conduzidas em condição mesofílica (35°C), em frascos âmbar de 525 mL (310mL de volume útil). Esses frascos foram autoclavados anteriormente ao uso e ao serem preenchidos com as misturas foram vedados com tampas de borracha, fita veda rosca e lacre de alumínio, com auxílio de alicate recravador. Logo após, foram colocados em shaker de agitação orbital com controle digital de temperatura e agitação (Marconi MA 410/CF), com a boca voltada para baixo para que não houvesse risco de escape de gases.

2.2.1 Fase Ia do ensaio de AME

Nesta primeira fase foram testados os diferentes substratos (Hac, mistura de Hac, HPr e butírico HBt, e o meio complexo) em diferentes concentrações (500, 1000 e 2000 mgO₂ L⁻¹). A partir da melhor produção da Ame, foi selecionado a melhor concentração e então dado sequencia nas demais fases. A Tabela 2 mostra as proporções de cada substrato utilizado em cada condição experimental.

Tabela 3 – Quantidades de lodo e substratos utilizados

Condição	Concentração Substrato (mg O ₂ L ⁻¹)	Substrato			Inóculo(mL)	
		Ácidos (mg L ⁻¹)				
		Acético	Propiônico	Butírico		
Controle	1C1	-	-	-	61,2	
	1C2	-	-	-	122,3	
	1C3	-	-	-	244,6	
Hac	2C1	500	1663,06	-	61,2	
	2C2	1000	3329,5	-	122,3	
	2C3	2000	6659	-	244,6	
Hac, HPr, HBt (Mix ácidos)	3C1	500	555,5	390,4	324,2	61,2
	3C2	1000	1111	784	648,6	122,3
	3C3	2000	2218,6	1568	1300,2	244,6
Complexo	4C1	500	-	-	-	61,2
	4C2	1000	-	-	-	122,3
	4C3	2000	-	-	-	244,6

Para cada condição da Fase Ia foi preparado, em um béquer, 1100 mL de solução contendo o substrato a ser estudado e lodo inóculo em quantidades específicas (Tabela 3), 2,75 mL das soluções stock A, B, C e D, e 11 mL da solução de vitaminas. As misturas foram avolumadas com água destilada, exceto para o substrato de Meio complexo que foi avolumado com a própria solução. As soluções stock e o Meio complexo foram armazenados em frascos Duran na geladeira.

A relação S/M foi fixada em 0,25 gO₂ gSVT⁻¹ e o pH em 7,5, o qual foi medido por um pHmetro digital (Geahka PG1800) e ajustado com hidróxido de sódio (5, 1 e 0,1 N). Foi transferido 310 mL da solução inicial para os frascos de penicilina. Para cada condição foi realizado um controle negativo composto de inóculo, meio nutriente, vitaminas e água destilada, afim de avaliar a real capacidade do inóculo em gerar metano.

2.2.2 Fase Ib do ensaio de AME

Na Fase Ib foi avaliado a relação S/M que gerasse melhores resultados de Ame e dos parâmetros cinéticos aparente do consumo de matéria orgânica (em termos de DQO). Para isso as relações de 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4 g O₂ gSVT⁻¹ foram analisadas. A montagem do ensaio foi conduzida conforme a Fase Ia, em triplicata, porém utilizando apenas ácido acético como fonte de carbono na concentração de 1000 mg O₂ L⁻¹, que foi o ensaio de melhor desempenho na fase anterior, para isso foi utilizado 3329,5 mg L⁻¹ de ácido e variou-se a quantidade de lodo inóculo conforme Tabela 4. As mesmas

quantidades das soluções stock A, B, C, D e vitaminas da Fase Ia foram acrescentadas as misturas.

Tabela 4. Quantidade de inóculo e ácido acético utilizados

Relação (gO ₂ gSVT ⁻¹)	Ácido Acético (mg L ⁻¹)	Inóculo (mL)
0,2	3329,5	152,9
0,5	3329,5	61,16
1,0	3329,5	30,58
1,5	3329,5	20,39
2,0	3329,5	15,29
3,0	3329,5	10,19
4,0	3329,5	7,65

O controle negativo foi conduzido também como na Fase Ia não sendo acrescentado a fonte de carbono e tendo as quantidades de lodo sendo variadas de acordo com a relação S/M. Com isso totalizaram 42 frascos para essa fase, sendo 6 para cada relação S/M, três com substrato e três controle negativo, conduzidos em 3 incubadoras de mesma marca e modelo.

2.2.3 Fase Ic e Id do ensaio de AME

Para a Fase Ic foram analisados os pHs de 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. A montagem ocorreu como nas fases anteriores, sendo fixada a relação S/M de 0,5 gO₂ gSVT⁻¹ que obteve melhores valores de Ame na fase anterior. Para a correção regulação do pH foram utilizados hidróxido de sódio (5, 1 e 0,1 N) e ácido sulfúrico (1 e 0,1 N). Nessa fase também foram preparados 42 frascos acondicionados em 3 shakers de mesma marca e modelo, sendo que para cada pH também foi conduzido um ensaio de controle negativo.

Na Fase Id foram avaliadas as agitações de 0, 40, 70 e 100 rpm. A montagem se deu como nas fases anteriores, sendo fixado o pH de 8,0, por obter melhores valores de Ame na fase anterior. Cada nível de agitação foi conduzido em uma shaker (todos de mesma marca e modelo), possuindo 6 frascos cada, três com a solução completa e três de controle negativo.

2.3 Análises

No início de cada ensaio foram realizadas análises da série de sólidos e concentração da demanda química de oxigênio (DQO). Durante o período da execução foram realizadas mais análises, as quais a metodologia e frequência empregada em cada uma são descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Frequência e metodologia utilizadas para monitoramento dos ensaios

Parâmetro	Frequência	Metodologia
pH	Início e fim	Método 4500-H+ eletrométrico
Sólidos (ST, SFT, SVT, SST, SSF, SSV)	Início e fim	Método 2540 (APHA, 2012b)
DQO	A cada 4h nas primeiras 24h, após semanal	Método 5220-D colorimétrico (APHA, 2012c)
Volume de CH₄	A cada 4h nas primeiras 24h, após, diário	Cromatógrafo Gasoso, Construmaq

Nas primeiras 24 horas, após o início da contagem do tempo de incubação, foram realizadas análises de DQO e CH₄ (pressão e volume). Após, foram realizadas diariamente análise de CH₄, e semanalmente análises de DQO. Quando houve estabilização da produção de biogás e do valor de DQO os frascos foram abertos e realizadas análises de DQO, série de sólidos e leitura do pH.

Para a análise de CH₄ foi utilizado o Cromatógrafo Gasoso com Detector de Condutividade Térmica (CG-DCT) da Construmaq®, com coluna Hayesp-D, temperatura de 75 °C, tendo o hidrogênio como gás de arraste. Uma amostra de 3mL de biogás foi coletada, de cada frasco, e inserida no amostrador do cromatógrafo para análise. Para a coleta uma seringa slip de 5 mL com uma agulha (13x4,5mm) na ponta foi utilizada. Após a retirada da amostra o headspace foi esvaziado com o auxílio de uma agulha 30x8mm, e uma fina camada de silicone foi passada na tampa para evitar a perda de biogás produzido.

A análise de série de sólidos realizada determinou sólidos totais (ST), sólidos fixos totais (SFT), sólidos voláteis totais (SVT), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV). Para realizar as análises da série de sólidos suspensos foram utilizadas membranas de fibra de vidro de porosidade de 0,7 µm e diâmetro de 47 mm da marca Sartorius®. As análises da DQO foram

realizadas utilizando o espectrofotômetro UV-VIS DR6000 da Hach®, com comprimento de ondas de $\lambda = 600$ nm.

2.3.1 Cinética e análise do biogás e da matéria orgânica

Para determinar os valores da Ame foi considerado a quantidade de sólido presente em cada frasco e a taxa máxima de conversão de metano, produzido diariamente. Para isso, foi utilizado um modelo de dupla sigmoidal de Boltzmann (MOCKAITIS et al., 2020) (Equação 1).

$$C_{CH_4}(t) = Pt \left(\frac{P}{1 + \exp\left(\frac{4 \cdot r_{max1} \cdot (tm1 - t)}{Pt \cdot P}\right)} + \frac{1 - P}{1 + \exp\left(\frac{4 \cdot r_{max2} \cdot (tm2 - t)}{Pt(1 - P)}\right)} \right) \quad (1)$$

em que Pt é a produção total de biogás (mL), P é a constante proporcional, r_{max1} e r_{max2} é a taxa máxima de conversão para cada exponencial e t_m (h) é o tempo para qual a produção exponencial de primeiro e segundo grau atingem taxa máxima.

Após foi realizado o cálculo da Ame, que considerou o volume de inóculo utilizado, o valor de SVT, a taxa máxima de conversão e a DQO de CH₄ (354) (Equação 2).

$$Ame = \frac{\frac{r_{max1} \cdot 24}{DQO_{CH_4}}}{\frac{SVT}{Vol_{inoculo}} \cdot 1000} \quad (2)$$

A análise da cinética da matéria orgânica foi realizada utilizando um modelo de 1ª ordem baseado em Monod para baixa concentração de substrato (MOCKAITIS et al., 2014) (Equação 3). Foi considerado para os cálculos as leituras de DQO.

$$C_{DQO} = C_r + (C_i - C_r) \cdot e^{-k_{app} \cdot t} \quad (3)$$

em que C é a concentração de matéria orgânica (mg O₂ L⁻¹), C_r é a concentração residual de matéria orgânica (g O₂ L⁻¹), C_i é a concentração inicial de matéria orgânica com o t 0 (mg O₂ L⁻¹), t é o tempo de incubação para C (h) e k_{app} é o coeficiente cinético aparente de primeira ordem (h⁻¹).

Ambos modelos foram calculados utilizando o software OriginPro e os gráficos foram elaborados utilizando excel.

3 Resultados e discussão

3.1 Fase Ia

A Figura 2 mostra os primeiros resultados obtidos em relação aos diferentes substratos utilizados tanto para a produção de CH_4 , como para remoção de matéria orgânica em termos de DQO para a Fase Ia.

Os resultados da concentração de $500 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ para qualquer substrato foi bem mais baixo em relação as outras duas concentrações, ficando a produção de metano para todos os substratos em torno de 40 a 30 NmL L^{-1} de inóculo (CNTP). Já para as concentrações de $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ e $2000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ a produção de CH_4 foi significativamente maior, atingindo valores maiores de que 100 NmL L^{-1} indicando que a quantidade de substrato menor que $500 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ não seria suficiente para um bom desempenho da Ame.

O meio Complexo apresentou menores produções de CH_4 em comparação com os ácidos voláteis usados diretamente como substrato, o que já era esperado, já que esse meio contém compostos orgânicos que não são tão facilmente convertidos a metano, o que pode levar a maiores dificuldades de produção em comparação com ácidos graxos voláteis (AGVs) que já estão prontamente disponíveis para consumo.

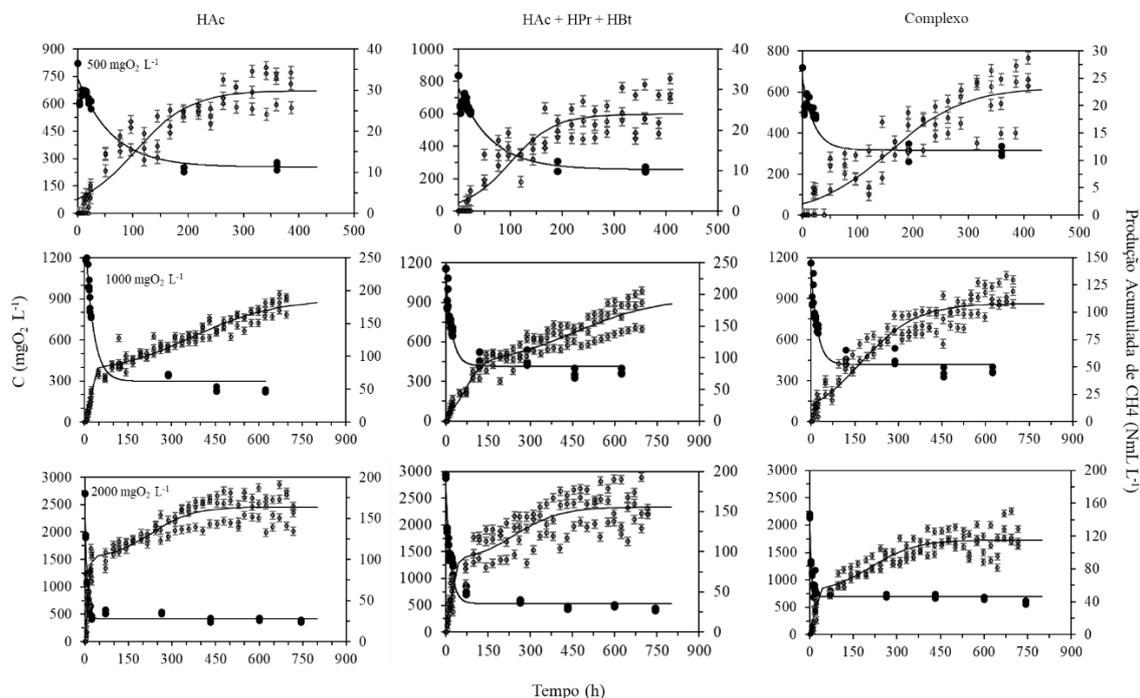


Figura 2. Valores experimentais e modelos ajustados para produção de CH_4 e consumo de matéria orgânica, em termos de DQO. Valores de CH_4 (Φ) produzidos por L de inóculo

utilizado, com barra de erro, valores de DQO (●), modelos ajustados (-). Vertical: diferentes concentrações, Horizontal: diferentes substratos.

O fato que chama a atenção nesses ensaios foi o comportamento relativamente parecido do uso de Hac sozinho e do mix de Hac, HPr e HBt. Nas diferentes concentrações, tanto a produção de CH₄ como a remoção de matéria orgânica, levaram ao mesmo padrão de ajuste cinético. Esse fato acaba sendo compatível com as rotas metabólicas, já que tanto o HBt como o HPr acabam sendo convertidos em Hac e este é o principal precursor do CH₄ (WANG et al., 2009). Entretanto, o Hac como único substrato, se mostrou ainda como a melhor opção, principalmente devido ao melhor ajuste de dados. Wang et al. (2009) mostrou que a melhor concentração de Hac para ser convertido em CH₄, é de 1600 mg L⁻¹, sugerindo que na concentração de 2000 mg O₂ L⁻¹ talvez possa acontecer inibição. Esse mesmo autor também mostrou que o ideal de HPr para não haver inibições seria de 300 mg L⁻¹ e 1800 mg L⁻¹ de HBt.

Levando em consideração que a remoção de matéria orgânica da condição HAc concentração 2000 mg O₂ L⁻¹ foi melhor, porém essa concentração pode gerar inibições, após a finalização dessa etapa da Fase Ia, foi visto que usar o HAc na concentração de 1000 mg O₂ L⁻¹ seria a melhor opção para prosseguir com as próximas fases experimentais analisando os diferentes parâmetros, porém, já fixando o uso do substrato.

Além disso, a Tabela 6 mostra os valores dos parâmetros cinéticos ajustados, indicando que o C_{CH₄}(t), que seria a produção máxima de CH₄ e C, que seria a remoção da matéria orgânica, foram respectivamente 186,8 mL e 1188 mg O₂ L⁻¹ para a melhor condição experimental. Apesar do uso do HAc ter sido 4,5% menor na produção máxima de CH₄ do que o do mix dos ácidos orgânicos, a Ame (Tabela 7) tendo o substrato de ácido acético na concentração de 1000 mg O₂ L⁻¹ foi de 56 mgDQO mgSVT⁻¹d. Os valores de Ame obtido com o meio complexo e com o mix de ácidos foram pelo menos 73% menor do valor máximo de Ame com o ácido acético. Souto et al. (2010) obteve 78 gDQO gSSV⁻¹d na concentração de 2 g L⁻¹ de ácido acético, sendo maior do que o resultado do presente estudo. Lozano et al. (2009), detectaram que a Ame usando acetato foi de 2,39 gDQO g⁻¹ SSV⁻¹d; 0,94 gDQO gSSV⁻¹d para formiato e 0,65 gDQO gSSV⁻¹ dia para metanol. Esse mesmo trabalho (Souto et al., 2010), mostrou que altas concentrações de acetato podem inibir a Ame de um lodo devido a toxicidade, e que

concentrações mais baixas (2g L^{-1}) pode favorecer metanogênicos com alto consumo de substrato.

Tabela 6. Resultado da remoção da matéria orgânica

Fase Ia	Hac			Hac+HPr+Hbut			Complex		
	500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000
C (mg O ₂ L ⁻¹)	490	1188	2353	507	1089	2087	333	687	1413
%	65,9	80,0	84,9	66,4	75,2	79,0	51,2	62,2	66,1
Relação S/M (mg O ₂ mg SVT ⁻¹)									
Fase Ib	0,2	0,5	1	1,5	2	3	4		
C (mg O ₂ L ⁻¹)	1281	999,25	810,32	*	*	899,39	*		
%	77,6	82,6	82,8	*	*	87,9	*		
pH									
Fase Ic	4	5	6	7	8	9	10		
C (mg O ₂ L ⁻¹)	-	-	1029	1152,71	1213,59	1193	1274,2		
%	-	-	83,9	85,5	85,0	84,1	84,9		
Rotação (rpm)									
Fase Id	0	40	70	100					
C (mg O ₂ L ⁻¹)	1257	1231,02	1207,89	1214					
%	82,9	82,9	79,9	85,0					

*não houve ajuste no modelo

Tabela 7. Resultado da produção máxima de metano e atividade metanogênica específica

		Substrato/concentração (mgO ₂ L ⁻¹)								
		Acético			Hac+HPr+Hbut			Complexo		
		500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000
Fase Ia	C _{CH₄} (mL)	29,9	186,8	163,9	23,9	195,7	155,6	23,3	107,9	115,3
	Média	16,9	106,6	121,5	14,1	101,8	108,7	11,3	68,9	75,5
	Desvio Padrão	11,9	55	52,62	10,5	57,3	55,2	8,9	39,2	42,5
	Erro Padrão	1,5	5,4	5,0	1,3	5,6	5,2	1,1	3,8	4,0
	Ame (mgDQO mgSVT ⁻¹ d)	3,9	56,1	42,0	3,7	10,1	15,7	2,3	3,7	15,5
		Relação S/M (gO ₂ gSVT ⁻¹)								
		0,2	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0		
Fase Ib	C _{CH₄} (mL)	204,6	141,06	98,9	66,8	185,9	155,6	-		
	Média	135,8	94,5	64,3	31,1	17	13	-		
	Desvio Padrão	58,5	42,7	32,2	26,3	16,6	13,8	-		
	Erro Padrão	5,6	4,1	3,1	4,5	1,6	1,3	-		
	Ame (mgDQO mgSVT ⁻¹ d)	22,5	26,8	23,5	12,5	19,1	15,7	-		
		pH								
		4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0		
Fase Ic	C _{CH₄} (mL)	-	-	60,5	157,5	149,9	151,7	176,4		
	Média	-	-	99,3	108,9	110,9	114,9	116,6		
	Desvio Padrão	-	-	52,5	45,0	42,3	43,5	50,4		
	Erro Padrão	-	-	4,6	4,0	3,7	3,8	4,4		
	Ame (mgDQO mgSVT ⁻¹ d)	-	-	11,5	41,7	83,1	*	80,1		

	Agitação			
	0 rpm	40 rpm	70 rpm	100 rpm
Fase Id				
CCH₄ (mL)	123	129,5	134,9	149,9
Média	90,9	93,7	96,7	110,9
Desvio Padrão	37,0	40,2	42,9	42,3
Erro Padrão	3,3	3,6	3,8	3,7
Ame (mgDQO mgSVT⁻¹d)	23,64	27,69	17,29	21,16

*não houve ajuste no modelo

3.2 Fase Ib

A Figura 3 mostra os resultados de produção de CH_4 e remoção de matéria orgânica para a relação S/M. As condições onde foram usadas mais de $2 \text{ gO}_2 \text{ gSVT}^{-1}$ indicam uma possível inibição por excesso de substrato, tanto na remoção de matéria orgânica como a produção de CH_4 , sendo que nas relações de 2 e 3 g não houve um bom ajuste nos parâmetros cinéticos e na relação de 4 g não houve produção de biogás. Já a relação S/M de $1.5 \text{ gO}_2 \text{ gSVT}^{-1}$ apesar de não mostrar um efeito inibitório, não possui um bom ajuste de dados cinéticos como as outras relações S/M.

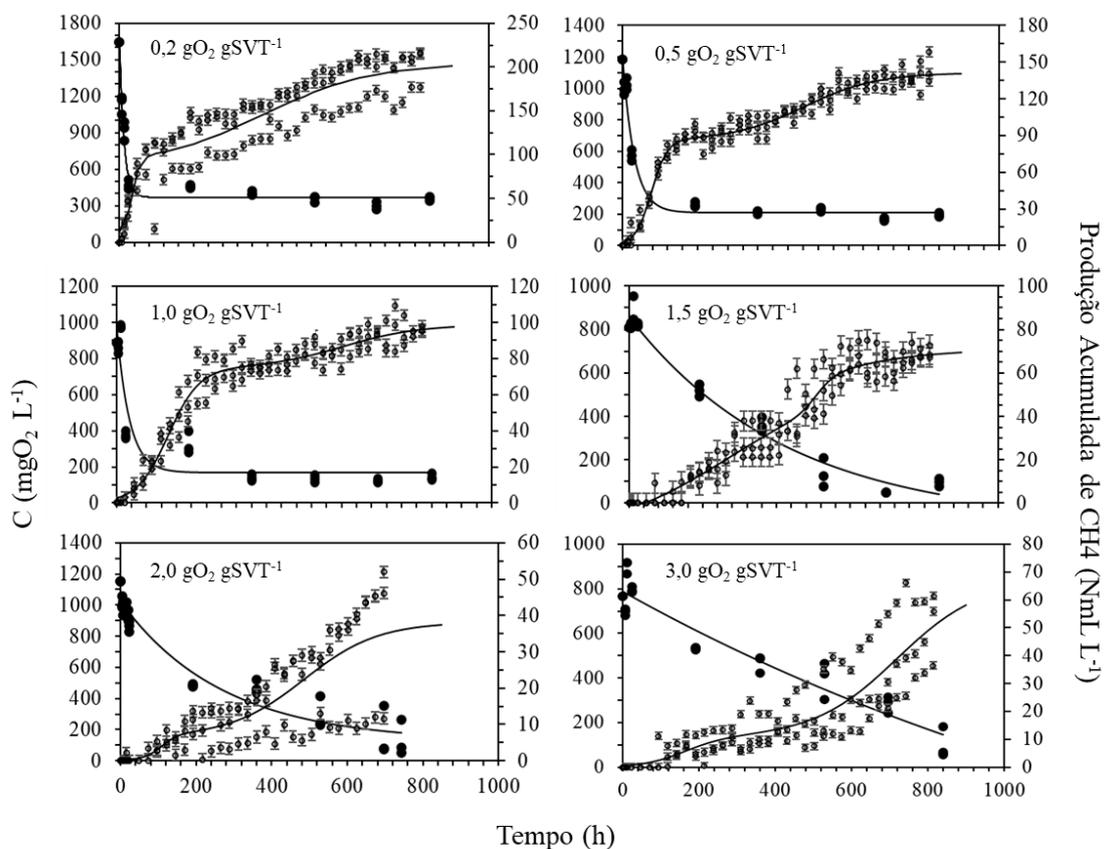


Figura 3. Valores experimentais e modelos ajustados para produção de CH_4 e consumo de matéria orgânica, em termos de DQO, para as diferentes relações S/M. Valores de CH_4 (Φ) com barra de erro, valores de DQO (\bullet), modelos ajustados (-).

Os valores da relação S/M de 0.2, 0.5 e $1.0 \text{ gO}_2 \text{ gSVT}^{-1}$ foram os que apresentaram melhores ajustes cinéticos, e melhores produção de CH_4 acompanhado com a remoção de matéria orgânica. Controlar a relação S/M se faz muito importante para o processo já que doses maiores de inoculação podem encurtar o start-up do reator, e ainda

umentar a taxa específica de produção de metano, porém o inóculo excessivo requer mais espaço e diminui a taxa de produção volumétrica de metano (ZHOU et al., 2017).

De maneira geral, a relação S/M de 0.5 gO₂ gSVT⁻¹ foi a que teve maior produção de CH₄, maiores valores de Ame, acompanhada de alta remoção de matéria orgânica. Tal fato pode ser comprovado com os parâmetros cinéticos destacados na Tabela 6, sugerindo que essa relação seria a ideal para uma possível Ame com o uso de HAc na concentração de 1000 mgO₂ L⁻¹. Esses valores estão condizentes com os encontrados na literatura, apesar de serem utilizados substratos diferentes. No trabalho de (ZHANG et al., 2019) razões S/M (1:2, 1:1 e 2:1) no desempenho e estabilidade do lote reatores anaeróbicos digerindo resíduos de alimentos foram testadas. Os resultados mostraram a produção ótima de biogás com 539,3 mL gSVT⁻¹ adicionado e boa estabilidade do processo no experimento com a menor relação S/M (1:2).

O controle da relação S/M é de extrema importância para evitar no início do reator o acúmulo de AGVs, e modificar toda a rota metabólica do processo. Vale lembrar que ele depende muito do tipo de substrato e inóculo que é usado. No mesmo seguimento concentrações de inóculo muito altas ou baixas podem interromper o processo de DA por exemplo afetando o tempo de fase lag, taxa de reações, consumo de nutriente, comportamento de crescimento de biomassa entre outros fatores (ALAVI-BORAZJANI; CAPELA; TARELHO, 2020).

Na relação S/M, a Ame da proporção de 0.5 g foi de 26.8 mgO₂ mgSVT⁻¹d, não estando tão diferente das proporções de 0.2 g e 1g. Entretanto, conforme discutido anteriormente, quanto maiores as concentrações de substrato, problemas de inibições podem surgir, o que reflete nos resultados de Ame das relações S/M de 2, 3 e 4g. Portanto na finalização da Fase Ib, após o uso do substrato HAc, conclui-se que para prosseguir para a próxima etapa experimental, seria então fixado o valor de 0.5 gO₂ gSVT⁻¹ na relação S/M.

3.3 Fase Ic

Após a definição do substrato e da relação S/M, foram testados os diferentes pHs para serem utilizados na atividade metanogênica. A literatura sugere que para produção de CH₄ seja usado pH na faixa de 7 a 8 (HAO et al., 2012; STALEY; DE LOS REYES; BARLAZ, 2011). Entretanto, é sempre importante que o pH seja controlado, já que qualquer mudança nele, acaba alterando as rotas metabólicas da DA e pHs abaixo de

5 podem inibir as arqueas metanogênicas, como no caso desse ensaio, em que nos pHs 4 e 5 não houve produção de metano (HAO et al., 2012).

A Figura 4 mostra os desempenhos para produção de CH_4 e remoção de matéria orgânica de cada pH. De maneira geral os pHs, a não ser os mais ácidos, não apresentaram baixa produção, o que já é esperado, já que a rota da metanogênese pode se enquadrar em pHs desde 6 até próximo a 9 (STALEY; DE LOS REYES; BARLAZ, 2011). Nos resultados apresentados, por se ter uma disponibilidade direta de ácido acético, era esperado maior produção de metano do pH próximo 6, porém o ensaio com pH 10 superou e produziu maior quantidade ($176 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1}$). Entretanto, os pHs 7, 8 e 10 apresentaram as maiores remoções de cargas orgânicas, próximo a 85%. O pH mais próximo ao alcalino pode indicar que uma rota de metanogenese hidrogenotrófica, pode estar sendo preferenciada no processo, apesar da disponibilidade direta de ácido acético. E uma outra possibilidade que não deve ser descartada, é que a rota de oxidação sintrófica de acetato (OSA) acoplado a metanogenese hidrogenotrófica também pode estar acontecendo, já que o Hac é a única fonte de substrato, e o pH ótimo está próximo do alcalino.

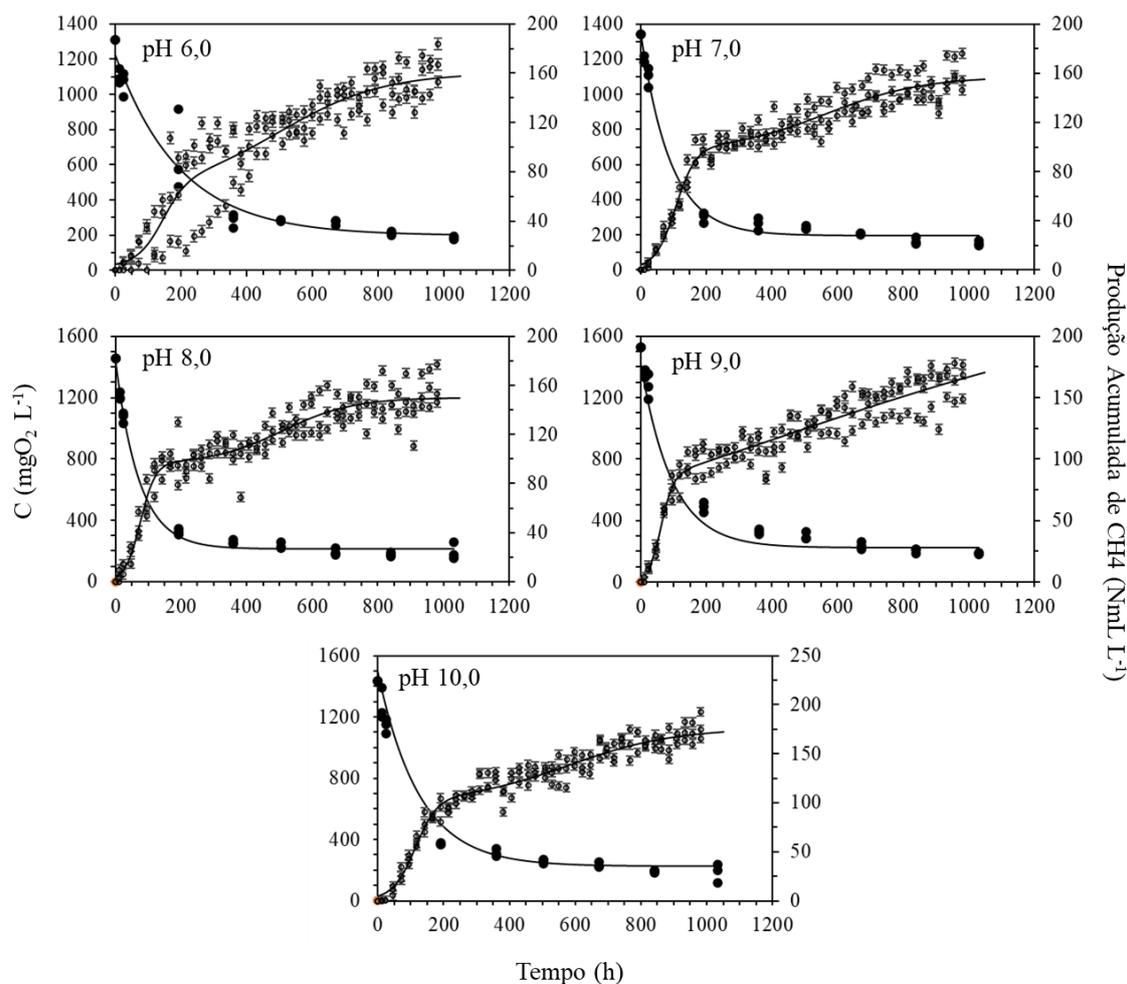


Figura 4. Valores experimentais e modelos ajustados para produção de CH₄ e consumo de matéria orgânica, em termos de DQO, para os diferentes pH's. Valores de CH₄ (Φ) com barra de erro, valores de DQO (●), modelos ajustados (-).

Essa versatilidade de uso de pH é possível por conta das duas rotas metabólicas para produção de metano: acetoclásticas ou hidrogenotrófico. Quanto mais alcalino o pH, a comunidade microbiana é selecionada, ficando menos versátil, proliferando mais archaea metanogênicas hidrogenotróficas, que preferenciam o consumo de hidrogênio para redução a CH₄. O pH quando fica mais próximo do ácido (5 < pH < 6) é esperado que tenha maior ação de archaea metanogênicas acetoclásticas, priorizando a redução do acetato a CH₄ (WORMALD et al., 2020).

Uma questão importante, é que esse inóculo, caracterizado em outro trabalho (VOLPI et al., 2021), apresentou comunidades microbianas características de OSA acopladas a metagênese hidrogenotróficas, como *Metanoculleus*. Apesar do substrato utilizado no presente estudo ter sido ácido acético, o inóculo já veio com uma

característica de população de archaea hidrogenotróficas que se desenvolvem melhor em pH alcalino.

Portanto diante dos dados, foi visto que o melhor pH para prosseguir, seria ou o pH 7, 8, 9 ou o pH 10. Entretanto, a velocidade de produção de CH_4 foi maior no pH 7 e 8, e nas tabelas 6 e 7 é possível verificar que os parâmetros cinéticos foram melhores na condição de pH 8, que apesar de ter uma produção de CH_4 máxima $149,9 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1}$, menor que no pH 10, teve uma remoção de matéria orgânica máxima de 85% e A_{me} de $83,1 \text{ gDQO gSVT}^{-1}\text{d}$, que é nosso valor de interesse.

3.4 Fase Id

Tendo definido o substrato, relação S/M e pH, foram testados as diferentes agitações, conforme mostra a Figura 5. De maneira geral, todas as agitações utilizadas apresentaram bons desempenhos, chegando a produção máxima de metano de $150 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1}$ e de 85% de remoção de matéria orgânica. A princípio poderia se considerar a menor agitação, ou o não uso de agitação, a fim de evitar gastos energéticos no processo. Mas quando se analisa de forma mais minuciosa, pode-se perceber que a velocidade de produção nas primeiras horas de experimento foi maior para a agitação de 100 rpm, em relação às outras agitações, já que foi atingido $100 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1}$ em menos de 200 horas de experimento. Sabe-se que a agitação é importante para diversos fatores, como evitar que archaea metanogênicas cresçam em determinados locais do reator, não semeando o restante, evitar um superdimensionamento dos digestores devido a um menor contato dos substratos com os microrganismos e baixa concentração de voláteis, evitar problemas de transferência de massa, e entupimentos (KARIYAMA; ZHAI; WU, 2018).

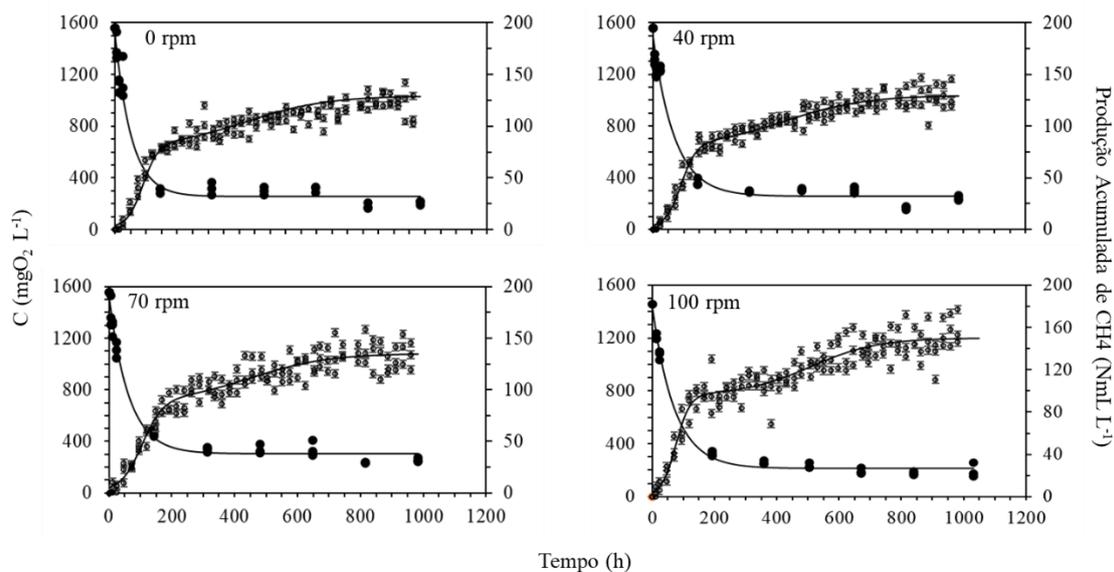


Figura 5. Valores experimentais e modelos ajustados para produção de CH_4 e consumo de matéria orgânica, em termos de DQO, para as diferentes agitações. Valores de CH_4 (Φ) com barra de erro, valores de DQO (\bullet), modelos ajustados (-).

As Tabelas 6 e 7 mostram os valores cinéticos para produção de CH_4 e remoção de matéria orgânica. Apesar da agitação de 100 rpm ter obtido maior produção de metano, a remoção da matéria orgânica ficou próxima em todas as condições, mas os maiores valores de Ame foram obtidos na agitação de 40 rpm e sem agitação (27,69 e 23,64 gDQO gSSV⁻¹d), apesar de a figura 4 ter mostrado indícios de que no ajuste cinético 100 rpm pode mostrar uma maior velocidade de produção de CH_4 . Levando em consideração que a agitação é um gasto a mais no processo, gasto no balanço energético e pode gerar problemas como degradações dos grânulos microbianos, o uso de 40 rpm é o mais indicado para ensaios de Ame, e em casos que não haja estrutura, talvez nem seja necessário a agitação para sistemas líquidos.

Considerando que esses ensaios foram feitos em frascos pequenos, o que geralmente é indicado para a Ame, a agitação talvez não seja um ponto que irá mostrar altas diferenças nos resultados. Vale ressaltar, que os substratos aqui usados são líquidos, e que caso seja utilizado um substrato sólido, maiores explorações devem ser consideradas. O trabalho de Souto et al. mostra que tanto a agitação de 200 rpm ou de 360 rpm, não deram diferenças significativas no resultado da Ame. O mesmo trabalho também cita a possibilidade de se realizar a agitação manual dos frascos e que isso não mostrou diferença significativa em relação a agitação orbital (SOUTO et al., 2010).

4 Conclusões

Os maiores valores de Ame foram conseguidos utilizando ácido acético como substrato a uma concentração de $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, comprovando que dentre os ácidos voláteis o HAc é o principal precursor de CH_4 . Mesmo a remoção da matéria orgânica sendo maior na concentração de $2000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ de HAc, a produção de metano e os valores de AME foram maiores na concentração de $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ de HAc.

A relação S/M de $0,5 \text{ gO}_2 \text{ gSVT}^{-1}$, obteve os melhores valores de Ame. Valores acima de $2 \text{ gO}_2 \text{ gSVT}^{-1}$, mesmo apresentando boa produção de CH_4 , há indícios de inibição da atividade microbiana já que apresentaram baixos valores de Ame.

O pH considerado ideal foi o 8,0, onde houve maiores resultados de Ame, produção de CH_4 e remoção da matéria orgânica. Em pH de 4 ou 5 não houve produção de CH_4 pois há inibição das archeas metanogênicas.

Agitação de 100 e 40 rpm foi a ideal apesar de apresentarem valores semelhantes, pode considerar a utilização de 40 rpm afim de evitar maiores gastos energéticos e degradação dos grânulos microbianos.

5 Referências

ALAVI-BORAZJANI, S. A.; CAPELA, I.; TARELHO, L. A. C. Over-acidification control strategies for enhanced biogas production from anaerobic digestion- A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, 2020.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, 2012a.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Method 2540 Solids. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: [s.n.]. p. 2-63 2-69.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Method 5220 Chemical Oxygen Demand. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012c. p. 5-16-5-28.

- AQUINO, S. F. et al. Methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic sludges. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016.
- DECHRUGSA, S.; KANTACHOTE, D.; CHAIPRAPAT, S. Effects of inoculum to substrate ratio, substrate mix ratio and inoculum source on batch co-digestion of grass and pig manure. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 101–108, 2013.
- DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. São Carlos, 1987.
- HAO, L.-P. et al. Shift of pathways during initiation of thermophilic methanogenesis at different initial pH. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 418–424, 2012.
- HIMANSHU, H. et al. Factors controlling headspace pressure in a manual manometric BMP method can be used to produce a methane output comparable to AMPTS. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 633–642, 2017.
- JIJAI, S. et al. **Specific Methanogenic Activities (SMA) and Biogas Production of Different Granules Size and Substrates**The Sukosol hotel. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/316062752>>.
- JIMÉNEZ, J. et al. Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 703–714, 1 jan. 2015.
- KARIYAMA, I. D.; ZHAI, X.; WU, B. Influence of mixing on anaerobic digestion efficiency in stirred tank digesters_ A review. **Water Research**, v. 143, p. 503–517, 2018.
- LOZANO, C. J. S. et al. Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 704–711, fev. 2009.
- MOCKAITIS, G. et al. Influence of feed time and sulfate load on the organic and sulfate removal in an ASBR. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6642–6650, 2010.
- MOCKAITIS, G. et al. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, 2014.
- MOCKAITIS, G. et al. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1388–1398, 1 jan. 2020.

- PENNA, J. A. Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica. **Universidade São Paulo Escola De Engenharia De São Carlos**, p. 182, 1994.
- SINBUATHONG, N. et al. **Effect of sulfate on the methanogenic activity of a bacterial culture from a brewery wastewater during glucose degradation** *Journal of Environmental Sciences*. [s.l: s.n.].
- SOUTO, T. F. et al. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. **Biodegradation**, v. 21, n. 3, p. 411–424, jun. 2010.
- SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewater**. [s.l.] Vanderbilt University, 1996.
- STALEY, B. F.; DE LOS REYES, F. L.; BARLAZ, M. A. Effect of spatial differences in microbial activity, pH, and substrate levels on methanogenesis initiation in refuse. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2381–2391, abr. 2011.
- STEIL, L. **Avaliação da Atividade Microbiana Anaeróbia Metanogênica na Lagoa de Estabilização Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários do Município de Cajati , Vale do Ribeira de Iguape , Estado de São Paulo .** , 2007.
- VOLPI, M. P. C. et al. Operational and biochemical aspects of co-digestion (co-AD) from sugarcane vinasse, filter cake, and deacetylation liquor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 23, p. 8969–8987, 1 dez. 2021.
- WANG, Y. et al. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 848–853, 2009.
- WOLLIN, E. A.; WOLLIN, M. J.; WOLPE, R. S. Formation of Methane by Bacterial Extracts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 8, p. 2882–2886, 1963.
- WORMALD, R. M. et al. Hydrogenotrophic Methanogenesis Under Alkaline Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 3 dez. 2020.
- ZHANG, W. et al. No difference in inhibition among free acids of acetate, propionate and butyrate on hydrogenotrophic methanogen of *Methanobacterium formicicum*. **Bioresource Technology**, v. 294, n. di, p. 122237, 2019.
- ZHOU, Y. et al. The effects of pre-aeration and inoculation on solid-state anaerobic digestion of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 78–86, 2017.

CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO DA SEMENTE DE
Moringa oleifera NA ATIVIDADE METANOGENICA
ESPECÍFICA

Influência da utilização de diferentes concentração do extrato da semente de *Moringa oleifera* na atividade metanogênica específica

Izabela Paiva Martins¹, Gustavo Mockaitis¹

¹ Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Resumo

A *Moringa oleifera* é uma árvore que tem se difundido pelo mundo e Brasil, sendo excelente fonte nutricional e atuando também como coagulante para tratamento de águas. Além disso, tem sido utilizada para reduzir a demanda química de oxigênio e melhorar a formação de grânulos nos lodos da digestão anaeróbia. Para avaliar melhor a capacidade dos microrganismos, presentes em um lodo utilizado como inóculo em converter matéria orgânica em metano, pode-se realizar ensaios de atividade metanogênica específica. O objetivo deste estudo foi analisar a interferência da utilização do extrato da semente de *Moringa oleifera* na atividade metanogênica específica e na degradação da matéria orgânica. Para conduzir os ensaios foram utilizados frascos de penicilina de 500mL contendo ácido acético na concentração de 1000mgO₂ L⁻¹, relação substrato microrganismo de 0,5mgO₂ mgSVT⁻¹, pH de 8 e agitação de 40rpm. Os frascos foram acomodados em um shaker de agitação orbital a uma temperatura de 35 °C. Foi feita uma solução aquosa de extrato da semente de *Moringa oleifera* com 2,5g de pó da semente para 1 litro de água destilada. As concentrações analisadas foram de 0,5, 1,0 e 2,0 mL L⁻¹ de solução, sendo realizadas em triplicata e conduzidos concomitante, ensaio controle, sem adição do extrato e com um meio nutriente. Os resultados obtidos foram que para a concentração de 1,0mL L⁻¹ o reator obteve maior velocidade de reação mesmo não tendo obtido melhores valores na conversão da matéria orgânica e na produção de metano. A concentração de 2,0mL L⁻¹ obteve os piores valores quanto a eficiência, sendo que o excesso de extrato pode aumentar a concentração de sedimentos. O ensaio controle, apesar de não ter tido boa eficiência, obteve os maiores valores de AME e na produção acumulada de metano. Sendo assim, a ideia de associar o extrato a uma solução extra de nutriente pode ser interessante.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, metano, atividade metanogênica específica

1 Introdução

A *Moringa oleifera* é uma árvore de crescimento rápido originária no Norte da Índia, e atualmente é encontrada, de forma difundida, no Oriente Médio, países africanos e em áreas tropicais e subtropicais (LEONE et al., 2016). É uma planta rica em diversos nutrientes entre eles ferro, cálcio, potássio, vitaminas e aminoácidos, sendo utilizadas raiz, semente e caule para diversas finalidades. Uma das utilizações é como coagulante de águas, removendo chumbo, ferro e íons de cádmio e redução da demanda química de oxigênio (DQO), além disso produz substratos que tem potencial de aumentar o rendimento biometano na digestão anaeróbia (DESTA; BOTE, 2021; DIMA et al., 2023; GAUTIER; DUARTE; SOUSA, 2022; LESTER-CARD et al., 2023).

Nos últimos anos o uso de biogás no Brasil aumentou significativamente, cerca de 50% em 5 anos, sendo sua produção realizada por digestão anaeróbia seja de resíduo sólido ou líquido (LEITE et al., 2023). Com isso, a ideia de otimizar essa produção por meio da utilização da correta quantidade de inóculo se faz interessante.

A atividade metanogênica específica (Ame) tem como finalidade a otimização do uso de inóculos para a produção de metano. A qualidade no processo de digestão anaeróbia é diretamente influenciada pela Ame, sendo os microrganismos presentes no lodo inóculo os responsáveis pela resposta rápida de conversão de compostos orgânicos em biogás (AQUINO et al., 2007; CHERNICHARO, 2016).

Lodos, utilizados como inóculo, com grânulos muito dispersos resulta em efeito negativo no resultado da digestão anaeróbia, podendo inibir a produção de gás. Isso pode ocorrer devido a características próprias do lodo, o qual possui células com pouca adesão, ou a agitação intensa no sistema (LINDMARK et al., 2014; ONG; GREENFIELD; PULLAMMANAPPALLIL, 2002). A coagulação do lodo melhora a eficiência no desempenho do tratamento, fazendo com que se tenha maiores partículas e agregados mais forte melhorando processo de espessamento (CHEN et al., 2016). Coagulantes utilizados com eficiência são sintéticos, caros e podem resultar em poluição da água. Como alternativa tem-se os coagulantes naturais, que além de ser seguro para a natureza e seres humanos, é econômico e produz um lodo biodegradável e rico em nutrientes (AHMAD et al., 2022; WEI et al., 2018).

A semente de *Moringa oleifera* pode ser utilizada, por meio de uma solução aquosa produzida com a semente em pó, pura ou associada a outros compostos químicos que potencializam seu efeito, como auxiliar nutricional e potencializando a formação de grânulos no lodo, sendo a dosagem variável a depender da finalidade de uso. Um estudo realizado observou resultados positivos com o extrato de semente de *Moringa oleifera* atuando como coagulante no tratamento de águas residuárias na usina de concreto (E SILVA; DE PAULA, 2019). Com isso, o extrato da semente se torna uma opção interessante para o auxílio da formação ou aglomeração de grânulos de inóculo.

Considerando o exposto, o estudo a seguir teve o objetivo de analisar a interferência do extrato da semente de *Moringa oleifera* na atividade metanogênica específica e na degradação da matéria orgânica de um lodo anaeróbio.

2 Materiais e métodos

2.1 Inóculo e condições experimentais

Para condução do ensaio foi utilizado como inóculo um lodo proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), oriundo do tratamento de água residuária industrial de abatedouro avícola, doado pela empresa Avícola Ideal, situada no município de Pereiras – SP. O teor de sólidos voláteis totais (SVT) desse lodo foi de $42,3 \pm 3,8$ g SVT L⁻¹ (APHA, 2012b). O mesmo foi mantido sob refrigeração, sendo retirado duas horas antes de sua utilização. O tempo de inoculação foi considerado a partir do momento que o inóculo foi adicionado, por isso o mesmo foi adicionado por último a mistura da solução.

Frascos de reação de 525 mL (310 mL de volume útil) foram utilizados como reatores com a finalidade de analisar a interferência de diferentes concentrações do extrato de *Moringa oleifera* na atividade metanogênica específica do lodo anaeróbio. Para isso os frascos foram preenchidos com uma solução contendo ácido acético, como substrato, a uma concentração de 1000 mgO₂ L⁻¹, relação substrato microrganismo de 0,5 gO₂ gSVT⁻¹, pH 8, sob agitação de 40 rpm, em condição mesofílica (35 °C).

Esses frascos foram autoclavados anteriormente ao uso e ao serem preenchidos com as misturas foram vedados com tampas de borracha, fita veda rosca e lacre de alumínio, com auxílio de alicate recravador. Logo após, foram colocados em shaker de agitação orbital com controle de temperatura (Marconi MA 410/CF), com a boca voltada para baixo, afim de evitar perdas de gases.

2.2 Extrato de *Moringa oleifera*

Para obter o extrato das sementes foram coletadas as vagens da planta no ponto em que começam a secar e abrir. Posteriormente, foram levadas a estufa a 65 °C por 24 h, sendo as sementes esfriadas no dessecador para serem descascadas. A solução foi preparada na noite anterior de sua utilização, afim de evitar a diminuição na concentração dos nutrientes e poder coagulante, conforme procedimentos já descritos em algumas literaturas (ARANTES; RIBEIRO; PATERNIANI, 2012; KALOGO; M'BASSIGUIÉ SÉKA; VERSTRAETE, 2001,). As sementes foram trituradas em liquidificador, sendo misturado 2,5g do pó à 1L de água destilada, formando uma solução de sementes secas de concentração de 2,5 g L⁻¹. Esta solução foi homogeneizada em agitador mecânico por 2 minutos e armazenada em frasco Duran a 4 °C. Previamente a utilização, a solução foi homogeneizada novamente, centrifugada por 30 minutos a 3000

rpm e o sobrenadante filtrado por filtração a vácuo utilizando filtro Sartorius de 0,7 µm de porosidade.

Como as sementes de *Moringa oleifera* são consideradas fonte de nutrientes, os ensaios conduzidos com adição do extrato não tiveram acréscimo de nutrientes extra. Juntamente com os ensaios, foram conduzidos um ensaio controle contendo apenas o inóculo e ácido acético e, outro ensaio contendo inóculo, ácido acético e um meio nutriente proposto por Del Nery (1987) juntamente com uma solução de vitaminas (Tabela 1) (WOLLIN; WOLLIN; WOLPE, 1963).

O extrato de *Moringa oleifera* foi caracterizado por Kalogo et al. (2001), porém em uma concentração dez vezes maior. Com isso, foi realizada uma equivalência nos valores da composição nutricional do extrato, afim de comparar com o meio nutriente utilizado (Tabela 1).

Tabela 1. Composição nutricional do extrato de *Moringa oleifera* e da solução nutriente utilizada (DEL NERY, 1987; KALOGO; M'BASSIGUIÉ SÉKA; VERSTRAETE, 2001; WOLLIN; WOLLIN; WOLPE, 1963)

Composição do extrato de <i>M. oleifera</i>	Valor desvio padrão (mg L ⁻¹)	Composição da solução nutriente	Concentração (mg L ⁻¹)
pH	0,574	NiSO ₄ . 6H ₂ O	0,5
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	5,245	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,5
NKT	68,485	FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,25
N-NH ₄ ⁺	0,249	CoCl ₂ . 2H ₂ O	0,04
N-NH ₃ ⁻	1,156	CaCl ₂ . 6H ₂ O	2,06
P-PO ₄ ³⁻	10,2	SeO ₂	0,14
AL	0,041	KH ₂ PO ₄	5,36
Cu	0,038	K ₂ HPO ₄	1,3
Fe	0,36	Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	2,76
Mo	3,5	Biotina	2,0
Ni	0,029	Ácido fólico	2,0
Zn	0,148	Cloridrato de piridoxina	1,0
Co	0,005	Riboflavina	5,0
Ca	37,5	Tiamina	5,0
K	7,89	Ácido nicótico	5,0
Mg	2,6	Ácido pantotênico	5,0
Na	1,1	B ₁₂	1,0
DQO (g L ⁻¹)	2,5	Ácido p-aminobenzóico	5,0
Glicose	92,5	Ácido p-aminobenzóico	5,0

A finalidade do ensaio com meio nutriente é verificar a qualidade do extrato em substituição à complementação nutricional na digestão anaeróbia. Com isso, há uma comparação entre a utilização ou não do meio nutriente e a comparação entre as diferentes doses de extrato de *Moringa oleifera*. Os ensaios foram conduzidos em triplicata sendo testadas as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mL L⁻¹ de solução de extrato. Em síntese, a condução experimental foi conforme a Figura 1.

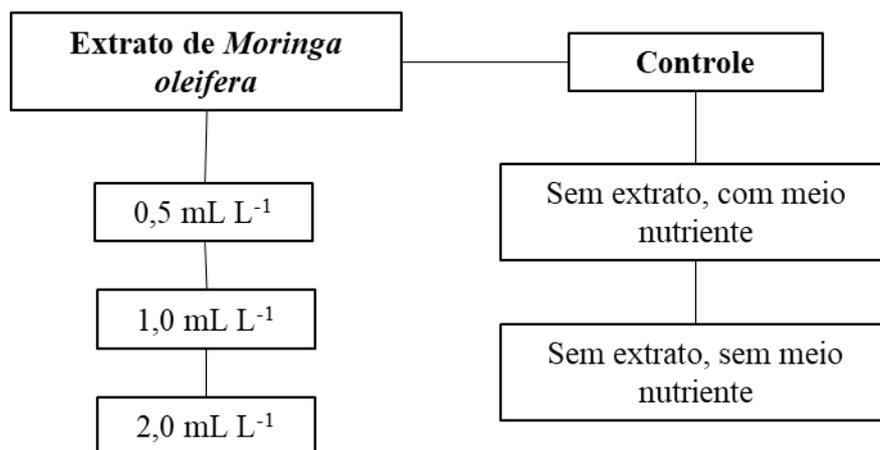


Figura1. Delineamento experimental.

2.3 Análises

Análises de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais, sólidos fixos totais, sólidos voláteis totais, sólidos suspensos totais, sólidos suspensos fixos e sólidos suspensos voláteis foram realizadas ao iniciar o ensaio. Nas primeiras 24 horas, após o início da contagem do tempo de incubação, foram realizadas análises de DQO e biogás no intervalo de 12 horas. Após, foram realizadas a cada dois dias análise de biogás, e semanalmente análises de DQO. Quando houve estabilização da produção de biogás e do valor de DQO, os frascos foram abertos e realizado medição do pH, e análises de DQO e série de sólidos.

A metodologia e frequência empregada em cada uma são descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequência e metodologia utilizada para monitoramento dos ensaios

Parâmetro	Frequência	Metodologia
pH	Início e fim	Método 4500- H ⁺ eletrométrico
Sólidos (ST, SFT, SVT, SST, SSF, SSV)	Início e fim	Método 2540 (APHA, 2012b)
DQO	A cada 4h nas primeiras 24h, após semanal	Método 5220-D colorimétrico (APHA, 2012c)
Produção de biogás	A cada 4h nas primeiras 24h, após, diário	Cromatógrafo Gasoso 2030, Shimadzu

Para a análise do biogás foi utilizado o Cromatógrafo Gasoso da Shimadzu, com detector de alta sensibilidade para fases inorgânicos e hidrocarbonetos, tendo o hélio como gás de arraste (SHIMADZU, 2021). Uma amostra de 5mL de biogás foi coletada de cada frasco e inserida no amostrador do cromatógrafo para análise. Para a coleta uma seringa slip de 5 mL com uma agulha (13x4,5mm) na ponta foi utilizada. Após a retirada da amostra o headspace foi esvaziado com o auxílio de uma agulha 30x8mm e uma fina camada de silicone foi passada na tampa para evitar a perda de biogás produzido.

A série de sólidos realizada determinou sólidos totais (ST), sólidos fixos totais (SFT), sólidos voláteis totais (SVT), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV). Para realizar as análises da série de sólidos suspensos foram utilizadas membranas de fibra de vidro de porosidade de 0,7 µm e diâmetro de 47 mm da marca Sartorius®. As análises da DQO foram realizadas utilizando o espectrofotômetro UV-VIS DR6000 da Hach®, com comprimento de ondas de $\lambda = 600$ nm.

2.3.1 Cinética da matéria orgânica e análise do biogás

Para determinar os valores de A_{me} foi considerado a quantidade de sólido presente em cada frasco e a taxa máxima de conversão de metano, produzido diariamente. Para isso, foi utilizado um modelo modificado de sigmoide simples de Boltzmann (MOCKAITIS et al., 2020) (Equação 1).

$$C_{CH_4}(t) = \frac{Pt}{1 + \exp\left(\frac{4 \cdot r_{max1} \cdot (tm1 - t)}{Pt}\right)} \quad (1)$$

em que P_t é a produção total de biogás (mL), P é a constante proporcional, $r_{\max 1}$ é a taxa máxima de conversão para a exponencial e t_m (h) é o tempo para qual a produção exponencial atinge taxa máxima.

A análise da cinética da matéria orgânica foi realizada utilizando um modelo de 1ª ordem baseado em Monod para baixa concentração de substrato, em termos de DQO (MOCKAITIS et al., 2014) (Equação 2).

$$C = C_r + (C_i - C_r) \cdot e^{-k_{app} \cdot t} \quad (2)$$

em que C é a concentração de matéria orgânica ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$), C_r é a concentração residual de matéria orgânica ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$), C_i é a concentração inicial de matéria orgânica com o $t = 0$ ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), t é o tempo de incubação para C (h) e k_{app} é o coeficiente cinético aparente de primeira ordem (h^{-1}).

Foi analisado também a relação da concentração de substrato residual e a inicial, eficiência máxima de remoção da matéria orgânica (ϵ_{\max}), sendo esse parâmetro relacionado ao desempenho do reator, quanto menor a relação, maior a eficiência do sistema. Para isso foi utilizado a equação 5.

$$\epsilon_{\max} = \frac{C_i - C_r}{C_i} \quad (3)$$

em que C_r é a concentração residual de matéria orgânica ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) e C_i é a concentração da matéria orgânica no tempo 0.

Afim de comparar as diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* e também comparar a viabilidade de utilização de uma solução nutriente, foi realizado análise de variância e teste de Tukey a 5% nos dados de produção de metano com o auxílio no programa Past. Ambos modelos cinéticos foram calculados utilizando o software OriginPro e os gráficos foram elaborados utilizando excel.

3 Resultados e discussão

A Figura 2 e a Tabela 4 apresentam os dados de aproveitamento da matéria orgânica e a conversão de biogás em resposta a utilização do extrato da semente de *Moringa oleifera*. O coeficiente cinético aparente de primeira ordem para a degradação da matéria orgânica, k_{app} , foi de $0,018 \pm 0,00159$ para a concentração de $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de extrato. Esse coeficiente está diretamente ligado ao desempenho do reator, sendo que quanto maior o valor de k_{app} maior a velocidade de reação. Porém, o menor valor para

esse coeficiente foi na concentração de 2 mL L^{-1} sugerindo que tenha sido concentração com melhor eficiência.

Entretanto, reatores podem ter boa eficiência em tempos diferentes, fazendo com que apresentem de uma forma geral melhor eficiência de reação e outros parâmetros não se destaquem. Nesse caso, ao analisar o desempenho do ensaio de concentração de 2 mL L^{-1} , pode-se perceber que o desempenho na remoção da matéria orgânica, na produção máxima de biogás e na atividade metanogênica específica não foi eficiente. Os valores na eficiência de remoção da matéria orgânica, e_{max} , ficaram próximos para todas as concentrações, tendo um baixo desempenho apenas no ensaio sem adição do extrato. Esses resultados mostram que a adição do extrato da semente pode favorecer o desempenho do reator, melhorando o processo de digestão anaeróbia e a produção de metano, como foi sugerido por Tambone et al. (2020). Esses resultados apresentados para a concentração de 1 mL L^{-1} mostram uma dualidade de velocidade de reação no reator que pode ser entendida pelo fato de ter tido bom desempenho de conversão de matéria orgânica em biogás, $24,3 \text{ mgDQO mgSVT}^{-1}\text{d}$, mesmo apresentando produção de metano acumulada mais baixa, $101,1 \text{ mL}$. Os valores de k_{app} e e_{max} indicam a eficiência do reator em determinado tempo de reação, explicando o que ocorreu com o ensaio, sendo eficiente em determinado momento e em outro não (GARCIA, 2005).

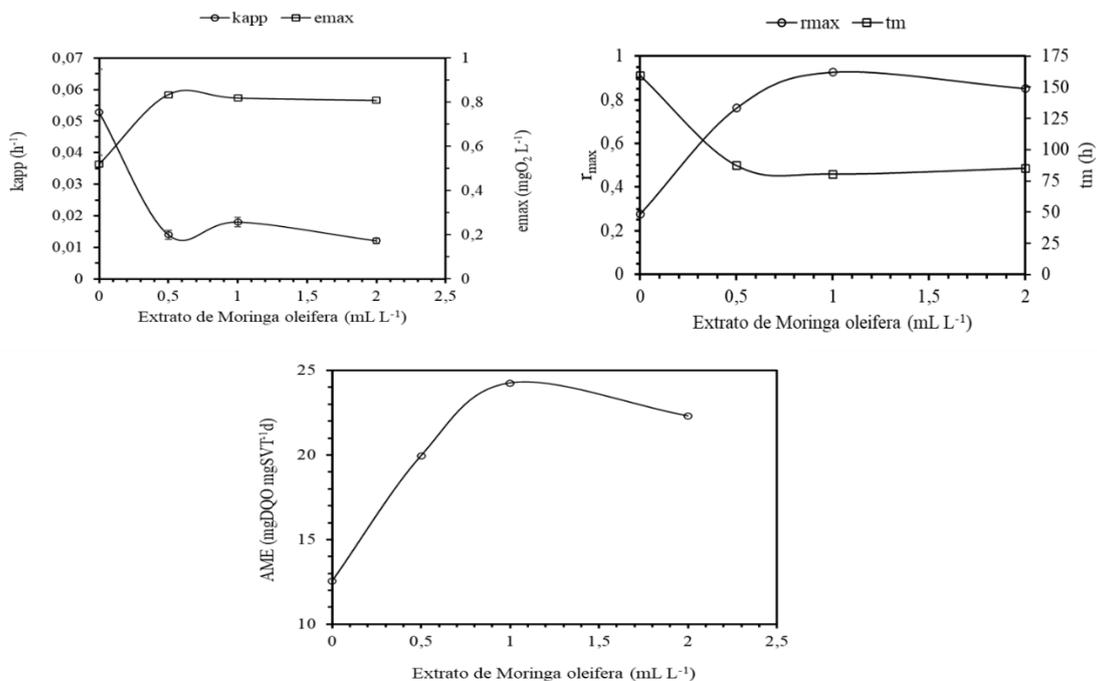


Figura 1. Valores experimentais do coeficiente cinético aparente e do erro máximo da concentração de DQO (k_{app} , e_{max}), taxa máxima de conversão de biogás e o tempo médio (r_{max} e t_m) e os valores de atividade metanogênica específica (AME) em relação às concentrações de extrato de semente de *Moringa oleifera*.

Tabela 3. Valores da produção máxima de metano, Ame, eficiência máxima e coeficiente cinético aparente para as diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera*.

Parâmetros	Concentração (mL L ⁻¹)			
	0,0	0,5	1,0	2,0
Max CH ₄ (mL)	1,7	103,5	101,1	101,9
AME (mgDQO mgSVT ⁻¹ d)	2,6	19,96	24,26	23,31
e_{max} (%)	0,52	0,83	0,82	0,81
K^{app} (h ⁻¹)	0,01429 ± 0,0017	0,01396 ± 0,00145	0,018 ± 0,00159	0,0121 ± 0,00091
r_{max}	0,48	0,76	0,93	0,85
t_m (h)	120,0	87,2	80,5	85,07

O ensaio controle apresentou o segundo maior valor do coeficiente de cinética aparente, k_{app} , acompanhado dos ensaios de concentração de 0,5 e 2,0 mL L⁻¹ de solução de extrato de semente de *Moringa oleifera*, 0,01429, 0,01396, 0,0121h⁻¹, respectivamente. Isso mostra que o ensaio controle teve maior velocidade de reação quando comparado com as concentrações de 0,5 e 2,0 mL L⁻¹. Esses valores mostram que o ensaio sem adição de extrato de semente de *Moringa oleifera*, apesar de não ter boa conversão da matéria orgânica em metano, teve boa velocidade de reação, o que sugere uma outra rota de produção que não seja a metanogênese. Apesar do ensaio de concentração de 2,0mL L⁻¹ não ter apresentado os menores valores para Ame e produção acumulada de metano, apresentou a pior eficiência de reação. Isso pode ter ocorrido pois o excesso na concentração de extrato de *Moringa oleifera* no sistema causa um excesso de coloides, o que acarreta um aumento de precipitados, fazendo com que o sistema não reaja bem com um excesso de grânulos (AMOOHADI et al., 2023). A eficiência de remoção da matéria orgânicas foi maior para a concentração de 1mL L⁻¹, mesmo essa concentração não apresentando maior produção de metano. Esses resultados mostram

que o reator tem apresentado boa eficiência em determinados momentos e que parte da matéria orgânica foi consumida e seguiu por outra rota metabólica.

A taxa máxima de produção do biogás, r_{max} , foi maior e ocorreu em menor tempo no ensaio de concentração $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de extrato de semente de *Moringa oleifera*, $0,93 \text{ mL h}^{-1}$. Essa variável mostra quando ocorre o máximo de produção de metano, sendo que para tal concentração aconteceu após $80,5 \text{ h}$ de inoculação do reator. Para as concentrações de $0,5$ e $2,0 \text{ mL L}^{-1}$ r_{max} foi de $0,76$ e $0,85 \text{ mL h}^{-1}$, ocorrendo nos tempos $87,2$ e $85,07 \text{ h}$ após a inoculação, respectivamente, já o ensaio controle apresentou r_{max} de $0,48 \text{ mL h}^{-1}$ após 120 h de inoculação. Esses valores sugerem que o inóculo tem a capacidade de converter matéria orgânica em biogás, porém, ao acrescentar nutrientes ao ambiente, os microrganismos melhoram sua eficiência.

A atividade metanogênica específica foi maior para o tratamento de concentração de 1 mL L^{-1} , $24,26 \text{ gDQO gSVT}^{-1}\text{d}$, seguidos das concentrações $2,0$ e $0,5 \text{ mL L}^{-1}$, as quais tiveram $23,31$ e $19,96 \text{ gDQO gSVT}^{-1}\text{d}$, respectivamente, como valores de Ame. Os valores obtidos nos ensaios com adição do extrato corroboram com os de Amooohadi et al. (2023), que obtiveram maior remoção de matéria orgânica bem como maior potencial metanogênico ao utilizar *Moringa oleifera* enriquecida com cloreto de ferro (III) ao inóculo utilizado nos reatores, na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Nesse mesmo estudo, ao utilizar uma dose considerada elevada de extrato houve um aumento de precipitados fazendo com que o sistema não fosse eficiente. O extrato de *Moringa oleifera* pode ser utilizado como parte da fonte de carbono na digestão anaeróbia, contribuindo naturalmente para a coagulação do lodo e potencializando a produção de biogás (AMOOHADI et al., 2023; YAP et al., 2021).

Apesar de não apresentar maior produção acumulada de metano, a concentração de $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de extrato de semente de *Moringa oleifera* apresentou maior velocidade de reação, bem como maior taxa máxima de produção de metano em menor tempo, mostrando o verdadeiro potencial na utilização do extrato.

Os resultados da comparação entre os ensaios que foi utilizado solução nutriente e os que não tiveram acréscimo de nenhuma fonte nutricional são apresentados na Tabela 4. É possível observar que a utilização de uma fonte de nutrientes é de fundamental importância para a digestão anaeróbia, melhorando a eficiência do reator, o tempo de reação, a produção de metano e a Ame. Tambone et al. (2020) ao analisarem a *Moringa oleifera* para a produção de biogás, concluíram que a planta é uma excelente fonte de nutriente para o processo de digestão anaeróbia, melhorando a produção de

biogás, em específico o metano. O que confirma estudos prévios que afirmam a capacidade da planta de suprir nutricionalmente o ser humano (GAUTIER; DUARTE; SOUSA, 2022).

Tabela 4. Valores da produção máxima de metano, Ame, eficiência máxima e coeficiente cinético aparente para os ensaios sem extrato de *Moringa oleifera* e com meio nutriente.

Parâmetros	Sem extrato, com nutriente	Sem extrato, sem nutriente
Kapp (-h)	0,053	0,014
rmax	0,81	0,48
emax (mgO₂ L⁻¹)	0,84	0,52
tm (h)	90,1	120,0
Ame (mgDQO mgSVT⁻¹d)	27,7	12,6
MaxCH₄ (mL)	129,5	1,7

Os nutrientes presentes no extrato de *Moringa oleifera* se assemelham com os adicionados ao meio nutriente proposto por Del Nery(1987), como é possível verificar na Tabela 1. Esses nutrientes, apesar de não se encontrarem na mesma concentração é de fundamental importância para incrementar o processo de digestão anaeróbia e melhorar o ambiente bacteriano (CHERNICHARO, 2016).

O resultado da análise de variância e do teste de Tukey é apresentado na Tabela 5. Foi observado que não houve diferença significativa entre a utilização do meio nutriente e as diferentes concentrações do extrato, assim como apenas entre as diferentes concentrações. Porém, quando comparado o acréscimo do meio nutriente ou do extrato de *Moringa oleifera* com a não adição de uma fonte nutricional, houve diferença significativa.

Tabela 5. Resultado da análise estatística para as diferentes relações.

Relação	Resultado
Diferentes concentrações de extrato (0,5 x 1,0 x 2,0 mL L ⁻¹)	Sem significância
Meio nutriente x diferentes concentrações de extrato	Sem significância
Meio nutriente x sem extrato	Diferença significativa
Sem extrato x diferentes concentrações de extrato	Diferença significativa

Os dados acima mostram que a adição do extrato de *Moringa oleifera* pode auxiliar na capacidade do inóculo em converter compostos orgânicos em biogás, porém o seu excesso pode acabar interferindo negativamente o processo. Nota-se também que a utilização de uma solução nutricional completa pode ser substituída pelo uso exclusivo do extrato da semente de *Moringa oleifera*.

Em suma, os resultados mostram que o extrato de *Moringa oleifera* se mostra uma opção como fonte de nutrientes benéficos para o processo de digestão anaeróbia, atuando em substituição de protocolos nutricionais já existentes e de alto custo para aquisição. O que fica de questionamento é se a adição da solução nutricional ao extrato incrementaria o meio de reação dos microrganismos ou seus metabolismos, favorecendo ou não a produção de metano bem como a remoção da matéria orgânica.

4 Conclusão

Por meio dos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização do extrato de semente de *Moringa oleifera* auxilia na melhor eficiência do reator, tanto na velocidade de reação quanto na remoção de matéria orgânica. No entanto sua adição em excesso pode ter efeito contrário, prejudicando a eficiência do reator e aumentando a quantidade de precipitados no seu interior, o que prejudica a atividade das bactérias.

O extrato de *Moringa oleifera* pode ser utilizado como substituto de soluções nutricionais químicas, se fazendo uma excelente alternativa de baixo custo que favorece o processo de digestão anaeróbia.

Para posteriores estudos, recomenda-se a avaliação do desempenho do reator com a adição de nutrientes à solução do extrato de semente de *Moringa oleifera* para verificar se há uma melhoria no processo ou uma inibição por excesso de nutrientes.

5 Referências

A *Moringa oleifera* é uma árvore de crescimento rápido originária no Norte da Índia, e atualmente é encontrada, de forma difundida, no Oriente Médio, países africanos e em áreas tropicais e subtropicais (LEONE et al., 2016). É uma planta rica em diversos nutrientes entre eles ferro, cálcio, potássio, vitaminas e aminoácidos, sendo utilizadas raiz, semente e caule para diversas finalidades. Uma das utilizações é como coagulante de águas, removendo chumbo, ferro e íons de cádmio e redução da demanda

química de oxigênio (DQO), além disso produz substratos que tem potencial de aumentar o rendimento biometano na digestão anaeróbia (DESTA; BOTE, 2021; DIMA et al., 2023; GAUTIER; DUARTE; SOUSA, 2022; LESTER-CARD et al., 2023).

Nos últimos anos o uso de biogás no Brasil aumentou significativamente, cerca de 50% em 5 anos, sendo sua produção realizada por digestão anaeróbia seja de resíduo sólido ou líquido (LEITE et al., 2023). Com isso, a ideia de otimizar essa produção por meio da utilização da correta quantidade de inóculo se faz interessante.

A atividade metanogênica específica (Ame) tem como finalidade a otimização do uso de inóculos para a produção de metano. A qualidade no processo de digestão anaeróbia é diretamente influenciada pela Ame, sendo os microrganismos presentes no lodo inóculo os responsáveis pela resposta rápida de conversão de compostos orgânicos em biogás (AQUINO et al., 2007; CHERNICHARO, 2016).

Lodos, utilizados como inóculo, com grânulos muito dispersos resulta em efeito negativo no resultado da digestão anaeróbia, podendo inibir a produção de gás. Isso pode ocorrer devido a características próprias do lodo, o qual possui células com pouca adesão, ou a agitação intensa no sistema (LINDMARK et al., 2014; ONG; GREENFIELD; PULLAMMANAPPALLIL, 2002). A coagulação do lodo melhora a eficiência no desempenho do tratamento, fazendo com que se tenha maiores partículas e agregados mais forte melhorando processo de espessamento (CHEN et al., 2016). Coagulantes utilizados com eficiência são sintéticos, caros e podem resultar em poluição da água. Como alternativa tem-se os coagulantes naturais, que além de ser seguro para a natureza e seres humanos, é econômico e produz um lodo biodegradável e rico em nutrientes (AHMAD et al., 2022; WEI et al., 2018).

A semente de *Moringa oleifera* pode ser utilizada, por meio de uma solução aquosa produzida com a semente em pó, pura ou associada a outros compostos químicos que potencializam seu efeito, como auxiliar nutricional e potencializando a formação de grânulos no lodo, sendo a dosagem variável a depender da finalidade de uso. Um estudo realizado observou resultados positivos com o extrato de semente de *Moringa oleifera* atuando como coagulante no tratamento de águas residuárias na usina de concreto (E SILVA; DE PAULA, 2019). Com isso, o extrato da semente se torna uma opção interessante para o auxílio da formação ou aglomeração de grânulos de inóculo.

Considerando o exposto, o estudo a seguir teve o objetivo de analisar a interferência do extrato da semente de *Moringa oleifera* na atividade metanogênica específica e na degradação da matéria orgânica de um lodo anaeróbio.

2 Materiais e métodos

2.1 Inóculo e condições experimentais

Para condução do ensaio foi utilizado como inóculo um lodo proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), oriundo do tratamento de água residuária industrial de abatedouro avícola, doado pela empresa Avícola Ideal, situada no município de Pereiras – SP. O teor de sólidos voláteis totais (SVT) desse lodo foi de $42,3 \pm 3,8$ g SVT L⁻¹ (APHA, 2012b). O mesmo foi mantido sob refrigeração, sendo retirado duas horas antes de sua utilização. O tempo de inoculação foi considerado a partir do momento que o inóculo foi adicionado, por isso o mesmo foi adicionado por último a mistura da solução.

Frascos de reação de 525 mL (310 mL de volume útil) foram utilizados como reatores com a finalidade de analisar a interferência de diferentes concentrações do extrato de *Moringa oleifera* na atividade metanogênica específica do lodo anaeróbio. Para isso os frascos foram preenchidos com uma solução contendo ácido acético, como substrato, a uma concentração de 1000 mgO₂ L⁻¹, relação substrato microrganismo de 0,5 gO₂ gSVT⁻¹, pH 8, sob agitação de 40 rpm, em condição mesofílica (35 °C).

Esses frascos foram autoclavados anteriormente ao uso e ao serem preenchidos com as misturas foram vedados com tampas de borracha, fita veda rosca e lacre de alumínio, com auxílio de alicate recravador. Logo após, foram colocados em shaker de agitação orbital com controle de temperatura (Marconi MA 410/CF), com a boca voltada para baixo, afim de evitar perdas de gases.

2.2 Extrato de *Moringa oleifera*

Para obter o extrato das sementes foram coletadas as vagens da planta no ponto em que começam a secar e abrir. Posteriormente, foram levadas a estufa a 65 °C por 24 h, sendo as sementes esfriadas no dessecador para serem descascadas. A solução foi preparada na noite anterior de sua utilização, afim de evitar a diminuição na concentração dos nutrientes e poder coagulante, conforme procedimentos já descritos em algumas literaturas (ARANTES; RIBEIRO; PATERNIANI, 2012; KALOGO; M'BASSIGUIÉ SÉKA; VERSTRAETE, 2001,). As sementes foram trituradas em liquidificador, sendo misturado 2,5g do pó à 1L de água destilada, formando uma solução de sementes secas de concentração de 2,5 g L⁻¹. Esta solução foi homogeneizada em

agitador mecânico por 2 minutos e armazenada em frasco Duran a 4 °C. Previamente a utilização, a solução foi homogeneizada novamente, centrifugada por 30 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante filtrado por filtração a vácuo utilizando filtro Sartorius de 0,7 µm de porosidade.

Como as sementes de *Moringa oleifera* são consideradas fonte de nutrientes, os ensaios conduzidos com adição do extrato não tiveram acréscimo de nutrientes extra. Juntamente com os ensaios, foram conduzidos um ensaio controle contendo apenas o inóculo e ácido acético e, outro ensaio contendo inóculo, ácido acético e um meio nutriente proposto por Del Nery (1987) juntamente com uma solução de vitaminas (Tabela 1) (WOLLIN; WOLLIN; WOLPE, 1963).

O extrato de *Moringa oleifera* foi caracterizado por Kalogo et al. (2001), porém em uma concentração dez vezes maior. Com isso, foi realizada uma equivalência nos valores da composição nutricional do extrato, afim de comparar com o meio nutriente utilizado (Tabela 1).

Tabela 1. Composição nutricional do extrato de *Moringa oleifera* e da solução nutriente utilizada (DEL NERY, 1987; KALOGO; M'BASSIGUIÉ SÉKA; VERSTRAETE, 2001; WOLLIN; WOLLIN; WOLPE, 1963)

Composição do extrato de <i>M. oleifera</i>	Valor desvio padrão (mg L ⁻¹)	Composição da solução nutriente	Concentração (mg L ⁻¹)
pH	0,574	NiSO ₄ . 6H ₂ O	0,5
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	5,245	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,5
NKT	68,485	FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,25
N-NH ₄ ⁺	0,249	CoCl ₂ . 2H ₂ O	0,04
N-NH ₃ ⁻	1,156	CaCl ₂ . 6H ₂ O	2,06
P-PO ₄ ³⁻	10,2	SeO ₂	0,14
AL	0,041	KH ₂ PO ₄	5,36
Cu	0,038	K ₂ HPO ₄	1,3
Fe	0,36	Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	2,76
Mo	3,5	Biotina	2,0
Ni	0,029	Ácido fólico	2,0
Zn	0,148	Cloridrato de piridoxina	1,0
Co	0,005	Riboflavina	5,0
Ca	37,5	Tiamina	5,0
K	7,89	Ácido nicótico	5,0
Mg	2,6	Ácido pantotênico	5,0
Na	1,1	B ₁₂	1,0
DQO (g L ⁻¹)	2,5	Ácido p-aminobenzóico	5,0

Glicose	92,5	Ácido p-aminobenzóico	5,0
---------	------	-----------------------	-----

A finalidade do ensaio com meio nutriente é verificar a qualidade do extrato em substituição à complementação nutricional na digestão anaeróbia. Com isso, há uma comparação entre a utilização ou não do meio nutriente e a comparação entre as diferentes doses de extrato de *Moringa oleifera*. Os ensaios foram conduzidos em triplicata sendo testadas as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mL L⁻¹ de solução de extrato. Em síntese, a condução experimental foi conforme a Figura 1.

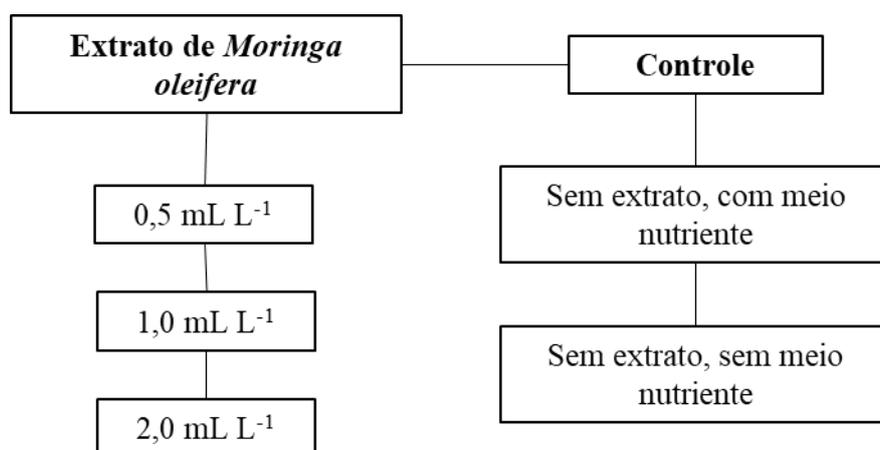


Figura1. Delineamento experimental.

2.3 Análises

Análises de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais, sólidos fixos totais, sólidos voláteis totais, sólidos suspensos totais, sólidos suspensos fixos e sólidos suspensos voláteis foram realizadas ao iniciar o ensaio. Nas primeiras 24 horas, após o início da contagem do tempo de incubação, foram realizadas análises de DQO e biogás no intervalo de 12 horas. Após, foram realizadas a cada dois dias análise de biogás, e semanalmente análises de DQO. Quando houve estabilização da produção de biogás e do valor de DQO, os frascos foram abertos e realizado medição do pH, e análises de DQO e série de sólidos.

A metodologia e frequência empregada em cada uma são descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequência e metodologia utilizada para monitoramento dos ensaios

Parâmetro	Frequência	Metodologia
pH	Início e fim	Método 4500- H ⁺ eletrométrico
Sólidos (ST, SFT, SVT, SST, SSF, SSV)	Início e fim	Método 2540 (APHA, 2012b)
DQO	A cada 4h nas primeiras 24h, após semanal	Método 5220-D colorimétrico (APHA, 2012c)
Produção de biogás	A cada 4h nas primeiras 24h, após, diário	Cromatógrafo Gasoso 2030, Shimadzu

Para a análise do biogás foi utilizado o Cromatógrafo Gasoso da Shimadzu, com detector de alta sensibilidade para fases inorgânicos e hidrocarbonetos, tendo o hélio como gás de arraste (SHIMADZU, 2021). Uma amostra de 5mL de biogás foi coletada de cada frasco e inserida no amostrador do cromatógrafo para análise. Para a coleta uma seringa slip de 5 mL com uma agulha (13x4,5mm) na ponta foi utilizada. Após a retirada da amostra o headspace foi esvaziado com o auxílio de uma agulha 30x8mm e uma fina camada de silicone foi passada na tampa para evitar a perda de biogás produzido.

A série de sólidos realizada determinou sólidos totais (ST), sólidos fixos totais (SFT), sólidos voláteis totais (SVT), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV). Para realizar as análises da série de sólidos suspensos foram utilizadas membranas de fibra de vidro de porosidade de 0,7 µm e diâmetro de 47 mm da marca Sartorius®. As análises da DQO foram realizadas utilizando o espectrofotômetro UV-VIS DR6000 da Hach®, com comprimento de ondas de $\lambda = 600$ nm.

2.3.1 Cinética da matéria orgânica e análise do biogás

Para determinar os valores de A_{me} foi considerado a quantidade de sólido presente em cada frasco e a taxa máxima de conversão de metano, produzido diariamente. Para isso, foi utilizado um modelo modificado de sigmoide simples de Boltzmann (MOCKAITIS et al., 2020) (Equação 1).

$$C_{CH_4}(t) = \frac{Pt}{1 + \exp\left(\frac{4 \cdot r_{max1} \cdot (tm1 - t)}{Pt}\right)} \quad (1)$$

em que P_t é a produção total de biogás (mL), P é a constante proporcional, $r_{\max 1}$ é a taxa máxima de conversão para a exponencial e t_m (h) é o tempo para qual a produção exponencial atinge taxa máxima.

A análise da cinética da matéria orgânica foi realizada utilizando um modelo de 1ª ordem baseado em Monod para baixa concentração de substrato, em termos de DQO (MOCKAITIS et al., 2014) (Equação 2).

$$C = C_r + (C_i - C_r) \cdot e^{-k_{app} \cdot t} \quad (2)$$

em que C é a concentração de matéria orgânica ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$), C_r é a concentração residual de matéria orgânica ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$), C_i é a concentração inicial de matéria orgânica com o $t = 0$ ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), t é o tempo de incubação para C (h) e k_{app} é o coeficiente cinético aparente de primeira ordem (h^{-1}).

Foi analisado também a relação da concentração de substrato residual e a inicial, eficiência máxima de remoção da matéria orgânica (ϵ_{\max}), sendo esse parâmetro relacionado ao desempenho do reator, quanto menor a relação, maior a eficiência do sistema. Para isso foi utilizado a equação 5.

$$\epsilon_{\max} = \frac{C_i - C_r}{C_i} \quad (3)$$

em que C_r é a concentração residual de matéria orgânica ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) e C_i é a concentração da matéria orgânica no tempo 0.

Afim de comparar as diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera* e também comparar a viabilidade de utilização de uma solução nutriente, foi realizado análise de variância e teste de Tukey a 5% nos dados de produção de metano com o auxílio no programa Past. Ambos modelos cinéticos foram calculados utilizando o software OriginPro e os gráficos foram elaborados utilizando excel.

3 Resultados e discussão

A Figura 2 e a Tabela 4 apresentam os dados de aproveitamento da matéria orgânica e a conversão de biogás em resposta a utilização do extrato da semente de *Moringa oleifera*. O coeficiente cinético aparente de primeira ordem para a degradação da matéria orgânica, k_{app} , foi de $0,018 \pm 0,00159$ para a concentração de $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de extrato. Esse coeficiente está diretamente ligado ao desempenho do reator, sendo que quanto maior o valor de k_{app} maior a velocidade de reação. Porém, o menor valor para

esse coeficiente foi na concentração de 2 mL L^{-1} sugerindo que tenha sido concentração com melhor eficiência.

Entretanto, reatores podem ter boa eficiência em tempos diferentes, fazendo com que apresentem de uma forma geral melhor eficiência de reação e outros parâmetros não se destaquem. Nesse caso, ao analisar o desempenho do ensaio de concentração de 2 mL L^{-1} , pode-se perceber que o desempenho na remoção da matéria orgânica, na produção máxima de biogás e na atividade metanogênica específica não foi eficiente. Os valores na eficiência de remoção da matéria orgânica, e_{max} , ficaram próximos para todas as concentrações, tendo um baixo desempenho apenas no ensaio sem adição do extrato. Esses resultados mostram que a adição do extrato da semente pode favorecer o desempenho do reator, melhorando o processo de digestão anaeróbia e a produção de metano, como foi sugerido por Tambone et al. (2020). Esses resultados apresentados para a concentração de 1 mL L^{-1} mostram uma dualidade de velocidade de reação no reator que pode ser entendida pelo fato de ter tido bom desempenho de conversão de matéria orgânica em biogás, $24,3 \text{ mgDQO mgSVT}^{-1}\text{d}$, mesmo apresentando produção de metano acumulada mais baixa, $101,1 \text{ mL}$. Os valores de k_{app} e e_{max} indicam a eficiência do reator em determinado tempo de reação, explicando o que ocorreu com o ensaio, sendo eficiente em determinado momento e em outro não (GARCIA, 2005).

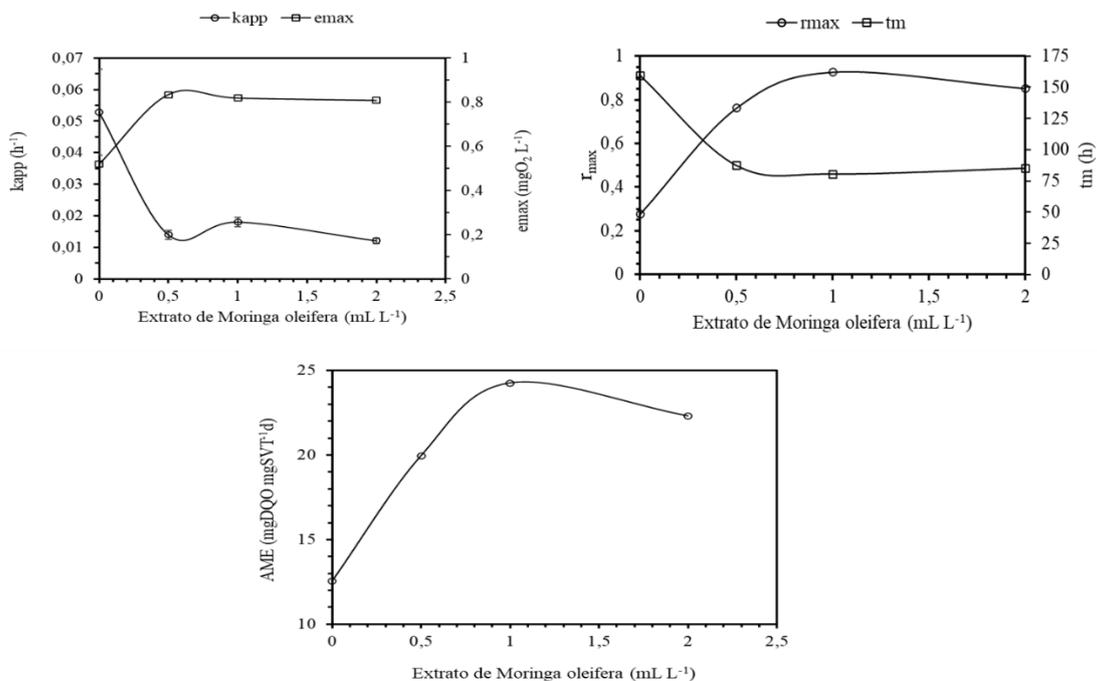


Figura 1. Valores experimentais do coeficiente cinético aparente e do erro máximo da concentração de DQO (k_{app} , e_{max}), taxa máxima de conversão de biogás e o tempo médio (r_{max} e t_m) e os valores de atividade metanogênica específica (AME) em relação às concentrações de extrato de semente de *Moringa oleifera*.

Tabela 3. Valores da produção máxima de metano, Ame, eficiência máxima e coeficiente cinético aparente para as diferentes concentrações de extrato de *Moringa oleifera*.

Parâmetros	Concentração (mL L ⁻¹)			
	0,0	0,5	1,0	2,0
Max CH ₄ (mL)	1,7	103,5	101,1	101,9
AME (mgDQO mgSVT ⁻¹ d)	2,6	19,96	24,26	23,31
e_{max} (%)	0,52	0,83	0,82	0,81
K^{app} (h ⁻¹)	0,01429 ± 0,0017	0,01396 ± 0,00145	0,018 ± 0,00159	0,0121 ± 0,00091
r_{max}	0,48	0,76	0,93	0,85
t_m (h)	120,0	87,2	80,5	85,07

O ensaio controle apresentou o segundo maior valor do coeficiente de cinética aparente, k_{app} , acompanhado dos ensaios de concentração de 0,5 e 2,0 mL L⁻¹ de solução de extrato de semente de *Moringa oleifera*, 0,01429, 0,01396, 0,0121h⁻¹, respectivamente. Isso mostra que o ensaio controle teve maior velocidade de reação quando comparado com as concentrações de 0,5 e 2,0 mL L⁻¹. Esses valores mostram que o ensaio sem adição de extrato de semente de *Moringa oleifera*, apesar de não ter boa conversão da matéria orgânica em metano, teve boa velocidade de reação, o que sugere uma outra rota de produção que não seja a metanogênese. Apesar do ensaio de concentração de 2,0mL L⁻¹ não ter apresentado os menores valores para Ame e produção acumulada de metano, apresentou a pior eficiência de reação. Isso pode ter ocorrido pois o excesso na concentração de extrato de *Moringa oleifera* no sistema causa um excesso de coloides, o que acarreta um aumento de precipitados, fazendo com que o sistema não reaja bem com um excesso de grânulos (AMOOHADI et al., 2023). A eficiência de remoção da matéria orgânicas foi maior para a concentração de 1mL L⁻¹, mesmo essa concentração não apresentando maior produção de metano. Esses resultados mostram

que o reator tem apresentado boa eficiência em determinados momentos e que parte da matéria orgânica foi consumida e seguiu por outra rota metabólica.

A taxa máxima de produção do biogás, r_{max} , foi maior e ocorreu em menor tempo no ensaio de concentração $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de extrato de semente de *Moringa oleifera*, $0,93 \text{ mL h}^{-1}$. Essa variável mostra quando ocorre o máximo de produção de metano, sendo que para tal concentração aconteceu após 80,5h de inoculação do reator. Para as concentrações de 0,5 e $2,0 \text{ mL L}^{-1}$ r_{max} foi de 0,76 e $0,85 \text{ mL h}^{-1}$, ocorrendo nos tempos 87,2 e 85,07h após a inoculação, respectivamente, já o ensaio controle apresentou r_{max} de $0,48 \text{ mL h}^{-1}$ após 120 h de inoculação. Esses valores sugerem que o inóculo tem a capacidade de converter matéria orgânica em biogás, porém, ao acrescentar nutrientes ao ambiente, os microrganismos melhoram sua eficiência.

A atividade metanogênica específica foi maior para o tratamento de concentração de 1 mL L^{-1} , $24,26 \text{ gDQO gSVT}^{-1}\text{d}$, seguidos das concentrações 2,0 e $0,5 \text{ mL L}^{-1}$, as quais tiveram 23,31 e $19,96 \text{ gDQO gSVT}^{-1}\text{d}$, respectivamente, como valores de Ame. Os valores obtidos nos ensaios com adição do extrato corroboram com os de Amooohadi et al. (2023), que obtiveram maior remoção de matéria orgânica bem como maior potencial metanogênico ao utilizar *Moringa oleifera* enriquecida com cloreto de ferro (III) ao inóculo utilizado nos reatores, na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Nesse mesmo estudo, ao utilizar uma dose considerada elevada de extrato houve um aumento de precipitados fazendo com que o sistema não fosse eficiente. O extrato de *Moringa oleifera* pode ser utilizado como parte da fonte de carbono na digestão anaeróbia, contribuindo naturalmente para a coagulação do lodo e potencializando a produção de biogás (AMOOHADI et al., 2023; YAP et al., 2021).

Apesar de não apresentar maior produção acumulada de metano, a concentração de $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ de extrato de semente de *Moringa oleifera* apresentou maior velocidade de reação, bem como maior taxa máxima de produção de metano em menor tempo, mostrando o verdadeiro potencial na utilização do extrato.

Os resultados da comparação entre os ensaios que foi utilizado solução nutriente e os que não tiveram acréscimo de nenhuma fonte nutricional são apresentados na Tabela 4. É possível observar que a utilização de uma fonte de nutrientes é de fundamental importância para a digestão anaeróbia, melhorando a eficiência do reator, o tempo de reação, a produção de metano e a Ame. Tambone et al. (2020) ao analisarem a *Moringa oleifera* para a produção de biogás, concluíram que a planta é uma excelente fonte de nutriente para o processo de digestão anaeróbia, melhorando a produção de

biogás, em específico o metano. O que confirma estudos prévios que afirmam a capacidade da planta de suprir nutricionalmente o ser humano (GAUTIER; DUARTE; SOUSA, 2022).

Tabela 4. Valores da produção máxima de metano, Ame, eficiência máxima e coeficiente cinético aparente para os ensaios sem extrato de *Moringa oleifera* e com meio nutriente.

Parâmetros	Sem extrato, com nutriente	Sem extrato, sem nutriente
Kapp (-h)	0,053	0,014
rmax	0,81	0,48
emax (mgO₂ L⁻¹)	0,84	0,52
tm (h)	90,1	120,0
Ame (mgDQO mgSVT⁻¹d)	27,7	12,6
Max_{CH₄} (mL)	129,5	1,7

Os nutrientes presentes no extrato de *Moringa oleifera* se assemelham com os adicionados ao meio nutriente proposto por Del Nery(1987), como é possível verificar na Tabela 1. Esses nutrientes, apesar de não se encontrarem na mesma concentração é de fundamental importância para incrementar o processo de digestão anaeróbia e melhorar o ambiente bacteriano (CHERNICHARO, 2016).

O resultado da análise de variância e do teste de Tukey é apresentado na Tabela 5. Foi observado que não houve diferença significativa entre a utilização do meio nutriente e as diferentes concentrações do extrato, assim como apenas entre as diferentes concentrações. Porém, quando comparado o acréscimo do meio nutriente ou do extrato de *Moringa oleifera* com a não adição de uma fonte nutricional, houve diferença significativa.

Tabela 5. Resultado da análise estatística para as diferentes relações.

Relação	Resultado
Diferentes concentrações de extrato (0,5 x 1,0 x 2,0 mL L ⁻¹)	Sem significância
Meio nutriente x diferentes concentrações de extrato	Sem significância
Meio nutriente x sem extrato	Diferença significativa
Sem extrato x diferentes concentrações de extrato	Diferença significativa

Os dados acima mostram que a adição do extrato de *Moringa oleifera* pode auxiliar na capacidade do inóculo em converter compostos orgânicos em biogás, porém o seu excesso pode acabar interferindo negativamente o processo. Nota-se também que a utilização de uma solução nutricional completa pode ser substituída pelo uso exclusivo do extrato da semente de *Moringa oleifera*.

Em suma, os resultados mostram que o extrato de *Moringa oleifera* se mostra uma opção como fonte de nutrientes benéficos para o processo de digestão anaeróbia, atuando em substituição de protocolos nutricionais já existentes e de alto custo para aquisição. O que fica de questionamento é se a adição da solução nutricional ao extrato incrementaria o meio de reação dos microrganismos ou seus metabolismos, favorecendo ou não a produção de metano bem como a remoção da matéria orgânica.

4 Conclusão

Por meio dos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização do extrato de semente de *Moringa oleifera* auxilia na melhor eficiência do reator, tanto na velocidade de reação quanto na remoção de matéria orgânica. No entanto sua adição em excesso pode ter efeito contrário, prejudicando a eficiência do reator e aumentando a quantidade de precipitados no seu interior, o que prejudica a atividade das bactérias.

O extrato de *Moringa oleifera* pode ser utilizado como substituto de soluções nutricionais químicas, se fazendo uma excelente alternativa de baixo custo que favorece o processo de digestão anaeróbia.

Para posteriores estudos, recomenda-se a avaliação do desempenho do reator com a adição de nutrientes à solução do extrato de semente de *Moringa oleifera* para verificar se há uma melhoria no processo ou uma inibição por excesso de nutrientes.

5 Referências

AHMAD, A. et al. **Exploring the extraction methods for plant-based coagulants and their future approaches.** *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 20 abr. 2022.

AMOOHADI, V. et al. A comparative study on polyaluminum chloride (PACl) and *Moringa oleifera* (MO) chemically enhanced primary treatment (CEPT) in enhanced

biogas production: anaerobic digestion performance and the Gompertz model. **RSC Advances**, v. 13, n. 25, p. 17121–17129, 9 jun. 2023.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Method 2540 Solids. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: [s.n.]. p. 2-63 2-69.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Method 5220 Chemical Oxygen Demand. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012b. p. 5-16-5–28.

AQUINO, S. F. et al. Methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic sludges. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.

ARANTES, C. C.; RIBEIRO, T. A. P.; PATERNIANI, J. E. S. Processing of Moringa oleifera seeds using different equipments to obtain coagulant solution. **Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental**, v. 16, n. 6, p. 661–666, 2012.

CHEN, W. et al. Fabricating a Flocculant with Controllable Cationic Microblock Structure: Characterization and Sludge Conditioning Behavior Evaluation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 10, p. 2892–2902, 16 mar. 2016.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. São Carlos, 1987.

DESTA, W. M.; BOTE, M. E. Wastewater treatment using a natural coagulant (Moringa oleifera seeds): optimization through response surface methodology. **Heliyon**, v. 7, n. 11, 1 nov. 2021.

DIMA, F. A. F. J. et al. Plant seed–based bio-coagulant development and application for fecal sludge treatment and biogas production improvement. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2023.

E SILVA, T. DE A. C.; DE PAULA, H. M. Water management in a concrete plant: Moringa oleifera employment analysis without wastewater treatment and reuse proposal after treatment. **Revista Materia**, v. 24, n. 2, 2019.

GARCIA, M. L. **Avaliação do material suporte no desempenho de reator anaeróbio operado em bateladas sequencias aplicado ao tratamento de esgoto sanitário**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2005.

- GAUTIER, A.; DUARTE, C. M.; SOUSA, I. Moringa oleifera Seeds Characterization and Potential Uses as Food. **Foods**, v. 11, n. 11, 1 jun. 2022.
- KALOGO, Y.; M'BASSIGUIÉ SÉKA, A.; VERSTRAETE, W. Enhancing the start-up of a UASB reactor treating domestic wastewater by adding a water extract of Moringa oleifera seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 5, p. 644–651, 1 maio 2011.
- LEITE, S. A. F. et al. The effects of agitation in anaerobic biodigesters operating with substrates from swine manure and rice husk. **Chemical Engineering Journal**, v. 451, 1 jan. 2023.
- LEONE, A. et al. **Moringa oleifera seeds and oil: Characteristics and uses for human health. International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 20 dez. 2016.
- LESTER-CARD, E. et al. A green approach for the treatment of oily steelworks wastewater using natural coagulant of Moringa oleifera seed. **Bioresource Technology Reports**, v. 22, p. 101393, jun. 2023.
- LINDMARK, J. et al. Effects of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 1030–1047, 2014.
- MOCKAITIS, G. et al. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, 2014.
- MOCKAITIS, G. et al. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1388–1398, 1 jan. 2020.
- ONG, H. K.; GREENFIELD, P. F.; PULLAMMANAPPALLIL, P. C. Effect of mixing on biomethanation of cattle-manure slurry. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 23, n. 10, p. 1081–1090, 1 out. 2002.
- SHIMADZU. **Sistema de cromatografia gasosa: Nexis GC-2030**.
- TAMBONE, F. et al. Moringa oleifera Lam. as an energy crop for biogas production in developing countries. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 10, p. 1083–1089, 2020.
- WEI, H. et al. **Coagulation/flocculation in dewatering of sludge: A review. Water Research** Elsevier Ltd, , 15 out. 2018.
- WOLLIN, E. A.; WOLLIN, M. J.; WOLPE, R. S. Formation of Methane by Bacterial Extracts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 8, p. 2882–2886, 1963.
- YAP, C. C. et al. Synergistic effect of anaerobic co-digestion of palm oil mill effluent (POME) with Moringa oleifera extract. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, 1 jan. 2021.

CONCLUSÕES FINAIS

Este trabalho conclui que o extrato da semente de *Moringa oleifera* tem potencial para melhorar a eficiência de reatores anaeróbios, desde que em quantidades moderadas. Sua utilização em grandes quantidades pode acarretar a inibição do processo anaeróbio. O extrato pode ser utilizado como substituto a meios nutrientes comerciais que, de uma forma geral, possuem alto custo.

Conclui-se também que para realizar ensaios de Ame o ideal é conduzir em ambiente mesofílico a uma agitação mais suave, 40 rpm, sendo possível a realização sem agitação, caso se faça necessário. Como substrato, o ideal é a utilização do ácido acético a uma concentração de $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ na relação substrato/microrganismo de $0,5 \text{ gO}_2 \text{ gSVT}^{-1}$, sendo que o excesso de substrato ou a alta relação S/M pode também desencadear uma inibição no processo de conversão de matéria orgânica em metano.

PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS

Como perspectiva de trabalhos futuros sugere-se que seja realizado testes de diferentes concentrações do extrato, afim de verificar qual limite de concentração é ideal para que haja o máximo aproveitamento no quesito nutricional. Além disso, se faz interessante caracterizar o extrato na concentração utilizada para que possa suplementar os nutrientes faltantes levando em consideração a comparação com os nutrientes propostos na literatura citada no trabalho.

Outra sugestão é a realização da análise microbiana do lodo, pois assim será possível verificar se o substrato favorece alguma família específica de microrganismos conversores de metano. Assim será possível potencializar a produção desse faz sem que haja necessidade de selecionar previamente alguma cepa bacteriana.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. et al. **Exploring the extraction methods for plant-based coagulants and their future approaches. Science of the Total Environment** Elsevier B.V., , 20 abr. 2022.

ALAVI-BORAZJANI, S. A.; CAPELA, I.; TARELHO, L. A. C. Over-acidification control strategies for enhanced biogas production from anaerobic digestion- A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, 2020.

AMOOHADI, V. et al. A comparative study on polyaluminum chloride (PACl) and Moringa oleifera (MO) chemically enhanced primary treatment (CEPT) in enhanced biogas production: anaerobic digestion performance and the Gompertz model. **RSC Advances**, v. 13, n. 25, p. 17121–17129, 9 jun. 2023.

ANGELIDAKI, I. et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 5, p. 927–934, 2009.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, 2012a.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Method 2540 Solids. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: [s.n.]. p. 2-63 2-69.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Method 5220 Chemical Oxygen Demand. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012c. p. 5-16-5–28.

AQUINO, S. F. et al. Methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic sludges. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.

ARANTES, C. C.; RIBEIRO, T. A. P.; PATERNIANI, J. E. S. Processing of Moringa oleifera seeds using different equipments to obtain coagulant solution. **Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental**, v. 16, n. 6, p. 661–666, 2012.

ARNAIZ, C.; GUTIERREZ, J. C.; LEBRATO, J. Support material selection for anaerobic fluidized bed reactors by phospholipid analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 240–245, jan. 2006.

BODKHE, S. Development of an improved anaerobic filter for municipal wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 222–226, jan. 2008.

CHEN, S.; SUN, D.; CHUNG, J. S. Anaerobic treatment of highly concentrated aniline wastewater using packed-bed biofilm reactor. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1666–1670, dez. 2007.

CHEN, W. et al. Fabricating a Flocculant with Controllable Cationic Microblock Structure: Characterization and Sludge Conditioning Behavior Evaluation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 10, p. 2892–2902, 16 mar. 2016.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016.

CHERNICHARO, C. A. L.; CAMPOS, C. M. M. A NEW METHODOLOGY TO EVALUATE THE BEHAVIOUR OF ANAEROBIC SLUDGE EXPOSED TO POTENTIALLY INHIBITORY COMPOUNDS. **Waf. Sci. Tech**, v. 24, n. 12, p. 201–210, 1991.

DECHRUGSA, S.; KANTACHOTE, D.; CHAIPRAPAT, S. Effects of inoculum to substrate ratio, substrate mix ratio and inoculum source on batch co-digestion of grass and pig manure. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 101–108, 2013.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. São Carlos, 1987.

DESTA, W. M.; BOTE, M. E. Wastewater treatment using a natural coagulant (Moringa oleifera seeds): optimization through response surface methodology. **Heliyon**, v. 7, n. 11, 1 nov. 2021.

DIMA, F. A. F. J. et al. Plant seed-based bio-coagulant development and application for fecal sludge treatment and biogas production improvement. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2023.

DOLFING, J.; BLOEMEN, W. G. B. M. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, p. 1–12, 1985.

E SILVA, T. DE A. C.; DE PAULA, H. M. Water management in a concrete plant: Moringa oleifera employment analysis without wastewater treatment and reuse proposal after treatment. **Revista Materia**, v. 24, n. 2, 2019.

GARCIA, M. L. **Avaliação do material suporte no desempenho de reator anaeróbio operado em bateladas sequencias aplicado ao tratamento de esgoto sanitário**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2005.

GAUTIER, A.; DUARTE, C. M.; SOUSA, I. Moringa oleifera Seeds Characterization and Potential Uses as Food. **Foods**, v. 11, n. 11, 1 jun. 2022.

HAO, L.-P. et al. Shift of pathways during initiation of thermophilic methanogenesis at different initial pH. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 418–424, 2012.

HIMANSHU, H. et al. Factors controlling headspace pressure in a manual manometric BMP method can be used to produce a methane output comparable to AMPTS. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 633–642, 2017.

INCE, O.; ANDERSON, G. K.; KASAPGIL, B. **CONTROL OF ORGANIC LOADING RATE USING THE SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY TEST DURING START-UP OF AN ANAEROBIC DIGESTION SYSTEM** *Wat. Res.* [s.l: s.n.].

JAITALEE, L.; DARARAT, S.; CHAVALPARIT, O. Bio-hydrogen Production Potential from Market Waste Bio-hydrogen Production Potential from Market Waste EnvironmentAsia. **Environment Asia**, v. 3, n. 2, p. 115–122, 2010.

JAMES, A.; CHERNICHARO, C. A. L.; CAMPOS, C. M. M. THE DEVELOPMENT OF A NEW METHODOLOGY FOR THE ASSESSMENT OF SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY. **Wat, Res**, v. 24, n. 7, p. 813–825, 1990.

JIJAI, S. et al. **Specific Methanogenic Activities (SMA) and Biogas Production of Different Granules Size and Substrates** *The Sukosol hotel*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/316062752>>.

JIMÉNEZ, J. et al. Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 703–714, 1 jan. 2015.

KALOGO, Y.; M'BASSIGUIÉ SÉKA, A.; VERSTRAETE, W. Enhancing the start-up of a UASB reactor treating domestic wastewater by adding a water extract of *Moringa oleifera* seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 5, p. 644–651, 1 maio 2001.

KARIYAMA, I. D.; ZHAI, X.; WU, B. Influence of mixing on anaerobic digestion efficiency in stirred tank digesters_ A review. **Water Research**, v. 143, p. 503–517, 2018.

KAYRANLI, B.; UGURLU, A. Effects of temperature and biomass concentration on the performance of anaerobic sequencing batch reactor treating low strength wastewater. **Desalination**, v. 278, n. 1–3, p. 77–83, 1 set. 2011.

KAYRANLI, B.; UGURLU, A. **Assessment of Methanogenic Activity and Kinetics of Anaerobic Granular Sludge.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/257298150>>.

LAKANIEMI, A. M.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers - A review. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 222–231, 2013.

LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. DEVELOPMENTS OF BACTERIAL POPULATION AND METHANOGENIC ACTIVITY IN A LABORATORY-SCALE LANDFILL BIOREACTOR. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3673–3679, 1998.

LE HYARIC, R. et al. Influence of substrate concentration and moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate spiked with propionate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 822–827, 2011.

LEE, J.; HWANG, S. Single and combined inhibition of *Methanosaeta concilii* by ammonia, sodium ion and hydrogen sulfide. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 401–411, 1 jun. 2019.

LEE, J.; KIM, E.; HWANG, S. Effects of inhibitions by sodium ion and ammonia and different inocula on acetate-utilizing methanogenesis: Methanogenic activity and

succession of methanogens. **Bioresource Technology**, v. 334, n. January, p. 125202, 2021.

LEITE, S. A. F. et al. The effects of agitation in anaerobic biodigesters operating with substrates from swine manure and rice husk. **Chemical Engineering Journal**, v. 451, 1 jan. 2023.

LEONE, A. et al. **Moringa oleifera seeds and oil: Characteristics and uses for human health. International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 20 dez. 2016.

LESTER-CARD, E. et al. A green approach for the treatment of oily steelworks wastewater using natural coagulant of Moringa oleifera seed. **Bioresource Technology Reports**, v. 22, p. 101393, jun. 2023.

LINDMARK, J. et al. Effects of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 1030–1047, 2014.

LIU, C. et al. Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 96–100, 15 maio 2016.

LOZANO, C. J. S. et al. Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 704–711, fev. 2009.

MD HUZIR, N. et al. Effect of Specific Methanogenic Activity (SMA) of Anaerobic Sludge under High Salinity. **Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology Journal homepage**, v. 16, p. 35–40, 2019.

MILÁN, Z. et al. Effect of natural and modified zeolite addition on anaerobic digestion of piggery waste. **Water Science and Technology** , v. 48, n. 6, p. 263–269, 2003.

MOCKAITIS, G. et al. Influence of feed time and sulfate load on the organic and sulfate removal in an ASBR. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6642–6650, 2010.

MOCKAITIS, G. et al. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, 2014.

MOCKAITIS, G. et al. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1388–1398, 1 jan. 2020.

MONTEGGIA, L. **The use of a specific methanogenic activity for controlling anaerobic reactors.** [s.l.] University of Newcastle upon Tyne, 1991.

OLINTO MONTEGGIA, L. **PROPOSTA DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO “ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA.”** 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...Foz do Iguaçu:** 1997.

ONG, H. K.; GREENFIELD, P. F.; PULLAMMANAPPALLIL, P. C. Effect of mixing on biomethanation of cattle-manure slurry. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 23, n. 10, p. 1081–1090, 1 out. 2002.

OWEN, W. F. et al. BIOASSAY FOR MONITORING BIOCHEMICAL METHANE POTENTIAL AND ANAEROBIC TOXICITY. **Water Research**, v. 13, p. 485–492, 1979.

PENNA, J. A. Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica. **Universidade São Paulo Escola De Engenharia De São Carlos**, p. 182, 1994.

SCHNEIDER, D. et al. Atividade metanogênica específica (AME) de lodos industriais provenientes do tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. **Revista Ambiente e Água**, v. 8, n. 2, p. 135–145, 2013.

SHIMADZU. **Sistema de cromatografia gasosa: Nexis GC-2030.**

SINBUATHONG, N. et al. **Effect of sulfate on the methanogenic activity of a bacterial culture from a brewery wastewater during glucose degradation** **Journal of Environmental Sciences.** [s.l.: s.n.].

SORENSEN, A. H.; AHRING, B. K. **Applied Microbiology Biotechnology Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass** **Appl Microbiol Biotechnol.** [s.l.: s.n.].

SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. METHANOGENIC AND NON-METHANOGENIC ACTIVITY TESTS. THEORETICAL BASIS AND EXPERIMENTAL SET UP. **Water Research**, v. 27, n. 8, p. 1361–1376, 1993.

SOUTO, T. F. et al. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. **Biodegradation**, v. 21, n. 3, p. 411–424, jun. 2010.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewater**. [s.l.] Vanderbilt University, 1996.

STALEY, B. F.; DE LOS REYES, F. L.; BARLAZ, M. A. Effect of spatial differences in microbial activity, pH, and substrate levels on methanogenesis initiation in refuse. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2381–2391, abr. 2011.

STEIL, L. **Avaliação da Atividade Microbiana Anaeróbia Metanogênica na Lagoa de Estabilização Anaeróbia da Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários do Município de Cajati , Vale do Ribeira de Iguape , Estado de São Paulo .** , 2007.

TAMBONE, F. et al. Moringa oleifera Lam. as an energy crop for biogas production in developing countries. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 10, p. 1083–1089, 2020.

VOLPI, M. P. C. et al. Operational and biochemical aspects of co-digestion (co-AD) from sugarcane vinasse, filter cake, and deacetylation liquor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 23, p. 8969–8987, 1 dez. 2021.

WANG, Y. et al. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 848–853, 2009.

WEI, H. et al. **Coagulation/flocculation in dewatering of sludge: A review**. **Water Research** Elsevier Ltd, , 15 out. 2018.

WOLLIN, E. A.; WOLLIN, M. J.; WOLPE, R. S. Formation of Methane by Bacterial Extracts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 8, p. 2882–2886, 1963.

WORMALD, R. M. et al. Hydrogenotrophic Methanogenesis Under Alkaline Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 3 dez. 2020.

YAP, C. C. et al. Synergistic effect of anaerobic co-digestion of palm oil mill effluent (POME) with Moringa oleifera extract. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, 1 jan. 2021.

ZHANG, W. et al. No difference in inhibition among free acids of acetate, propionate and butyrate on hydrogenotrophic methanogen of *Methanobacterium formicicum*. **Bioresource Technology**, v. 294, n. di, p. 122237, 2019.

ZHOU, M. et al. Methanogenic activity and microbial communities characteristics in dry and wet anaerobic digestion sludges from swine manure. **Biochemical Engineering Journal**, v. 152, 15 dez. 2019.

ZHOU, Y. et al. The effects of pre-aeration and inoculation on solid-state anaerobic digestion of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 78–86, 2017.

ZWIETERING, M. H. et al. **Modeling of the Bacterial Growth Curve** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. [s.l.: s.n.].