

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ENZIMAS E MICRORGANISMOS
SOBRE A DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS BOVINOS E
SUÍNOS**

Lorenzo Santi
Agroecólogo

**Jaboticabal - SP
2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ENZIMAS E MICRORGANISMOS
SOBRE A DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS BOVINOS E
SUÍNOS**

Lorenzo Santi

Orientador: Prof. Dr. Jorge de Lucas Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Jaboticabal - SP

2013

S235i Santi, Lorenzo
Influência da adição de enzimas e microrganismos sobre a
digestão anaeróbia de dejetos bovinos e suínos / Lorenzo Santi. --
Jaboticabal, 2013
iv, 57 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Jorge de Lucas Junior
Banca examinadora: Mauro dal Secco Oliveira, Monica Sarolli Silva
de Mendonca Costa
Bibliografia

1. Biogás. 2. Digestão anaeróbia. 3. Enzima. 4. Metano I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 661.9:636.2/.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lorenzo Santi – 10/11/1983 – Bologna (Itália). Realizou o curso de Scienze del territorio e dell'ambiente agroforestale junto a Alma Mater Studiorum – Università di Bologna (Bologna – Itália), concluído em 2006. No mesmo ano, ingressou na especialização em agroecologia junto à Università di Torino (Torino – Itália) que concluiu em 2008. Em 2011 ingressou no programa de pós-graduação em Zootecnia, nível mestrado, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob a orientação do Prof. Dr. Jorge de Lucas Junior.

*Dai diamanti non nasce niente
dal letame nascono i fior
(Fabrizio de Andrè)*

A minha esposa,
a minha família
e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos vão ao meu orientador, Prof. Jorge de Lucas Junior, pelo constante apoio e as preciosas sugestões;

aos funcionários do laboratório de biomassa do Dep. de Engenharia Rural da FCAV, pela incomensurável ajuda, foi graças a eles que as coisas aconteceram;

a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo por ter me concedido a bolsa de mestrado que garantiu a minha manutenção;

aos colegas e amigos, pelo suporte material, mas sobretudo moral.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IV
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Hidrólise	6
3.2 Acidogênese	7
3.3 Acetogênese	8
3.4 Metanogênese	9
3.5 A etapa limitante	11
3.6 Pré-tratamentos enzimáticos	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Local	16
4.2 Tratamentos	16
4.3 Delineamento experimental	17
4.4 Metodologia	19
4.5 Parâmetros medidos	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Dejeito bovino – Fase 1	29
5.2 Dejeito suíno – Fase 1	32
5.3 Resultados da Fase 1	36
5.4 Fase 2 - PEB	37
5.5 Fase 2 – PMM	41
5.6 pH, Alcalinidade e Acidez	44
5.7 ST, SV e CZ	48
5.8 Resultados da Fase 2	49
5 CONCLUSÕES	51
6 IMPLICAÇÕES	52
REFERÊNCIAS	53

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ENZIMAS E MICRORGANISMOS SOBRE A DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS BOVINOS E SUÍNOS.

RESUMO – O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, objetivando-se avaliar os benefícios da utilização de dois ativadores biológicos comerciais, Microsource “S”[®] e uma mistura de microrganismos e enzimas (*B. subtilis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, lipase, protease e lactase) na digestão anaeróbia de dejetos de bovino de corte e de dejetos suínos. Na primeira parte do experimento foram testadas duas doses de cada produto com os dois dejetos, utilizando 30 digestores batelada, a fim de determinar qual produto e em qual dose proporcionaria o maior aumento na produção específica de biogás (PEB). O tempo de retenção hidráulica (TRH) dos dejetos bovinos nos digestores batelada foi de 150 dias e dos suínos 100 dias. Periodicamente foram calculados o volume de biogás produzido e os teores de CH₄ e CO₂. Ao término da primeira fase foi escolhido, para a segunda fase do experimento, o produto Microsource “S”[®] na dose de 500g/t de dejetos. Na segunda fase do experimento foram utilizados 12 biodigestores contínuos, com TRH de 30 dias, a fim de testar o tratamento escolhido em um processo anaeróbio de tipo contínuo. Nesta fase foram repetidas as análises supracitadas com maior frequência, a fim de se monitorar a evolução do processo. A análise da variância, efetuada com o software SAS[®], apontou como o Microsource “S”[®], aplicado a dejetos de bovinos de corte, na dose de 500g por tonelada de substrato, proporciona um aumento de 15,03% na PEB.

Palavras-chave:

biogás, digestão anaeróbia, enzima, metano

INFLUENCE OF THE ADICTION OF ENZYMES AND MICROORGANISMS ON ANAEROBIC DIGESTION OF BEEF CATTLE AND SWINE MANURE.

ABSTRACT – A trial was carried out at the Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences, UNESP, Jaboticabal, aiming to evaluate the benefits of using two commercial biological activators, Microsource “S”[®] and a mixture of enzymes and microorganisms (*B. subtilis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, lipase, protease e lactase) in the anaerobic digestion of beef cattle and swine manure. During the first stage of the experiment, two doses of each product have been tested with the two manures in order to determine which dose of which product provide the highest increase of specific biogas production, using 30 batch digesters. The hydraulic retention time have been of 150 days for the beef cattle manure and 100 days for the swine manure. Periodically produced volume of biogas and contents of CH₄ and CO₂ have been calculated. At the end of the first stage has been selected for the second phase of the experiment the product Microsource “S”[®] at a dose of 500g/t of manure. In the second stage of the experiment 12 anaerobic digesters have been used to test the chosen treatment in a continuous anaerobic process with a 30 days hydraulic retention time. At this stage the tests were repeated more often above, in order to monitor the progress of the process. The analysis of variance, performed with SAS[®] software, pointed out Microsource "S"[®], applied to beef cattle at a dose of 500 g per ton of substrate, provides an increase of 15,03% in biogas specific production.

Keywords:

biogas, anaerobic digestion, enzyme, methane

LISTA DE ABREVIATURAS

CZ - cinzas

DQO - demanda química de oxigênio

DQOS - demanda química de oxigênio solúvel

g - grama

kJ - kilojoule

L - litro

mg - miligrama

mm - milímetro

mol - mol

OHPA - obligate hydrogen-producing acetogens (acetogênicas produtoras de hidrogênio)

PEB - produção específica de biogás

PMM - porcentual médio de metano

ppm - partes por milhão

SST - sólidos suspensos totais

SSV - sólidos suspensos voláteis

ST - sólidos totais

SV - sólidos voláteis

t - tonelada

TRH - tempo de retenção hidráulica

U - unidade enzimática

1 INTRODUÇÃO

Tudo o que se consome ou se utiliza requer energia para ser produzido, embalado e distribuído. Daí a relevância das diversas fontes de energia para a humanidade. Fontes estas que podem ser renováveis, como a hidráulica e eletricidade, lenha e carvão vegetal, derivados da cana-de-açúcar ou não renováveis, tais como petróleo, gás natural, carvão mineral, urânio e derivados (PIMENTEL et al., 2009).

De acordo com os dados do Balanço Energético Nacional de 2011, as principais fontes de energia para o consumo no segmento agropecuário foram óleo diesel (57,3%), lenha (24,7%), energia elétrica (17,6%) e outros (0,4%) (BRASIL, 2012). No triênio 2009-2011, dados oficiais disponíveis mostraram elevação dos preços pagos pela energia, visto que os preços do óleo diesel apresentaram aumento de 17% e da energia elétrica de 27%. Somente o preço de lenha apresentou uma pequena queda, igual ao 6% no período.

Neste sentido, o desenvolvimento e a implementação de alternativas tecnológicas visando a geração de energia a custos reduzidos para este segmento, podem gerar impactos socioeconômicos positivos. Uma das alternativas tecnológicas mais promissoras diz respeito ao aproveitamento da biomassa para geração de energia (GALBIATTI et al., 2010).

No meio rural, os sistemas de aproveitamento da biomassa para fins energéticos, podem ser um meio facilitador para atingir a sustentabilidade da produção em função da disponibilidade de biomassa nas propriedades agrícolas, do grande potencial de geração de energia, da diminuição no potencial poluidor dos resíduos, da redução na pressão sobre os recursos naturais e economia de recursos energéticos (ANGONESE et al., 2006).

Em particular, quando se trata de dejetos de animais, vale a pena lembrar que há áreas em que a criação intensificou-se, até alcançar proporções industriais, gerando muitas vezes desequilíbrios entre produção vegetal e animal, em favor da segunda. Uma das primeiras consequências do afastamento entre prática agrônoma e zootécnica é a produção de dejetos em quantidades muito superiores às que as áreas com produção agrícola podem receber.

A correta gestão dos dejetos animais é, em primeiro lugar, uma questão de conservação do solo: se efetuada de uma maneira irracional, ou seja, aplicando grandes quantidades de dejetos em poucos hectares, pode levar a uma das mais graves formas de alteração do equilíbrio ambiental, ou seja, a poluição do solo.

Além da degradação do solo, os problemas mais delicados causados pela descarga descontrolada de dejetos, são os que concernem à qualidade da água e o consequente excesso de substâncias nutritivas presentes nela. Esse tipo de poluição tem duas consequências principais: o aumento da população bacteriana que inviabiliza vários possíveis empregos da água e a eutrofização. Esse último fenômeno, em particular, configura-se como um excessivo crescimento das algas naturalmente presentes nos corpos hídricos, que, depois de mortas, entram em decomposição. A decomposição das algas consome o oxigênio dissolvido na água, inviabilizando o ambiente para a maioria das formas de vida. Além disso, por deixar as águas turvas e com coloração esverdeada, a eutrofização é altamente impactante também do ponto de vista visual.

Dessa forma os dejetos animais se tornam um resíduo a ser gerenciado ou tratado gerando custos altos, seja para alugar áreas de terreno capazes de recebê-los, seja para tratá-los num processo depurativo que também requer muita energia.

Nesse contexto, a proposta da digestão anaeróbia se tornou muito interessante, pois é um processo que, quando iniciado, além de não gastar energia, ainda a produz em forma de biogás. A digestão anaeróbia é um processo de degradação biológico da matéria orgânica que acontece em ausência de oxigênio, determinando a formação de uma mistura gasosa composta principalmente por CH_4 e CO_2 , comumente chamada de biogás.

O biogás, rico em metano, pode ser facilmente transformado em energia térmica, mecânica ou elétrica. Com um biodigestor uma empresa ou uma comunidade pode adquirir certa independência energética ou, caso o biogás seja utilizado para produção de eletricidade, se tornar até exportadora para a rede nacional, com benefícios econômicos mais ou menos importantes.

Além disso, a digestão anaeróbia permite recuperar o potencial fertilizante dos dejetos, pois nos processos depurativos aeróbios, os compostos do nitrogênio são oxidados ou reduzidos e assim perdidos. O processo anaeróbio, pelo contrário,

estabiliza os compostos nitrogenados, diminuindo as emissões de mau cheiro e deixando os elementos fertilizantes mais disponíveis para as plantas.

Para pequenos produtores rurais, pequenas comunidades ou também assentamentos rurais, a implantação de um biodigestor e o uso do biogás podem proporcionar grandes benefícios em termos econômicos, sociais e ambientais. Tais benefícios aumentam em caso de núcleos com baixa renda (menor que 2 salários mínimos), pois nesses casos os gastos energéticos (eletricidade e gás de cozinha) podem chegar a representar 6% das despesas. Além disso, a utilização do material biodigerido como adubo autoproduzido de ótima qualidade, em substituição aos adubos químicos, produz ulterior economia, garantindo também estabilidade e qualidade da produção (PIMENTEL et al., 2009)

O armazenamento e tratamento dos resíduos animais em estruturas fechadas também contribuem para a diminuição das emissões de gás de efeito estufa, pois, o metano, fruto da decomposição do material orgânico, é considerado um dos principais causadores do aquecimento global (ORRICO; ORRICO; LUCAS Jr, 2011). Mesmo que o tempo de vida do metano na atmosfera (cerca de 12 anos) seja inferior ao da CO₂ (estimado como variável entre 30 e 95 anos) , o seu poder de retenção da radiação infravermelha é muito maior. De fato, o metano é considerado 21 vezes mais poluidor que a CO₂ quando se considera o efeito estufa.

Segundo estimativas da FAO (2010), o setor agropecuário brasileiro foi responsável, no ano de 2010, por 411,067 milhões de toneladas de emissão de CO₂. O manejo dos dejetos, por sua vez, gerou emissões iguais a 117,497 milhões de toneladas, representando cerca de 28% do total do setor. Em particular, as criações de bovinos de corte e de suínos são apontadas como as atividades que proporcionam o maior impacto em termos de emissões de CH₄ e CO₂. Dentre estas diversas atividades, o manejo correto dos dejetos pode então trazer benefícios, tanto para o meio ambiente como para melhorar a renda das unidades produtoras de animais, visto que o metano pode ser utilizado como fonte de energia alternativa aos combustíveis fósseis, que oneram o custo de produção e impactam o meio ambiente.

Além das vantagens já citadas, a digestão anaeróbia tem a capacidade de fornecer calor e energia elétrica, disponíveis localmente, proporcionando

oportunidades de desenvolvimento socioeconômico para as populações rurais, contrastando o êxodo rural e contribuindo a uma gestão mais ativa e sustentável dos recursos agroflorestais (CECCHI, et al., 2005). Muitas vezes, naquelas comunidades rurais cujos únicos combustíveis são a lenha ou os restos da colheita, a conservação e o desenvolvimento sustentável são a única maneira de impedir a progressiva degradação do ambiente. Neste sentido, o biogás consegue conjugar as exigências econômicas em curto prazo destas comunidades com a conservação e o fim da degradação ecológica (MARCHAIM, 1992).

2 OBJETIVO

Foi planejado um experimento com o objetivo de avaliar os benefícios da utilização de dois ativadores biológicos comerciais, o Microsource "S"[®] (da empresa DSM) e uma mistura de microrganismos e enzimas (*B. subtilis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, lipase, protease e lactase) na digestão anaeróbia de dejetos de bovino de corte e de dejetos suínos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A digestão anaeróbia é, então, um dos sistemas mais interessantes para o tratamento de resíduos orgânicos, mesmo com alto teor de umidade, que mal se prestariam à serem tratados com outros sistemas. Os dejetos animais, em particular, são ótimos substratos para serem utilizados na digestão anaeróbia “simples” ou em co-digestão, ou seja, junto com outros substratos e, ainda, eles já contêm em proporções ótimas todos os microrganismos necessários ao bom desenvolvimento do processo.

A digestão anaeróbia é um processo bioquímico de demolição da substância orgânica que acontece em ausência de oxigênio devido à vários grupos de microrganismos que se diferenciam pelos substratos utilizados e também pelos produtos do metabolismo (SANTI, 2008).

O escopo da digestão anaeróbia é a estabilização da substância orgânica por meio da produção de subprodutos finais com alto valor agregado. O inteiro processo pode ser dividido em 4 fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, como esquematicamente ilustrado na Figura 1.

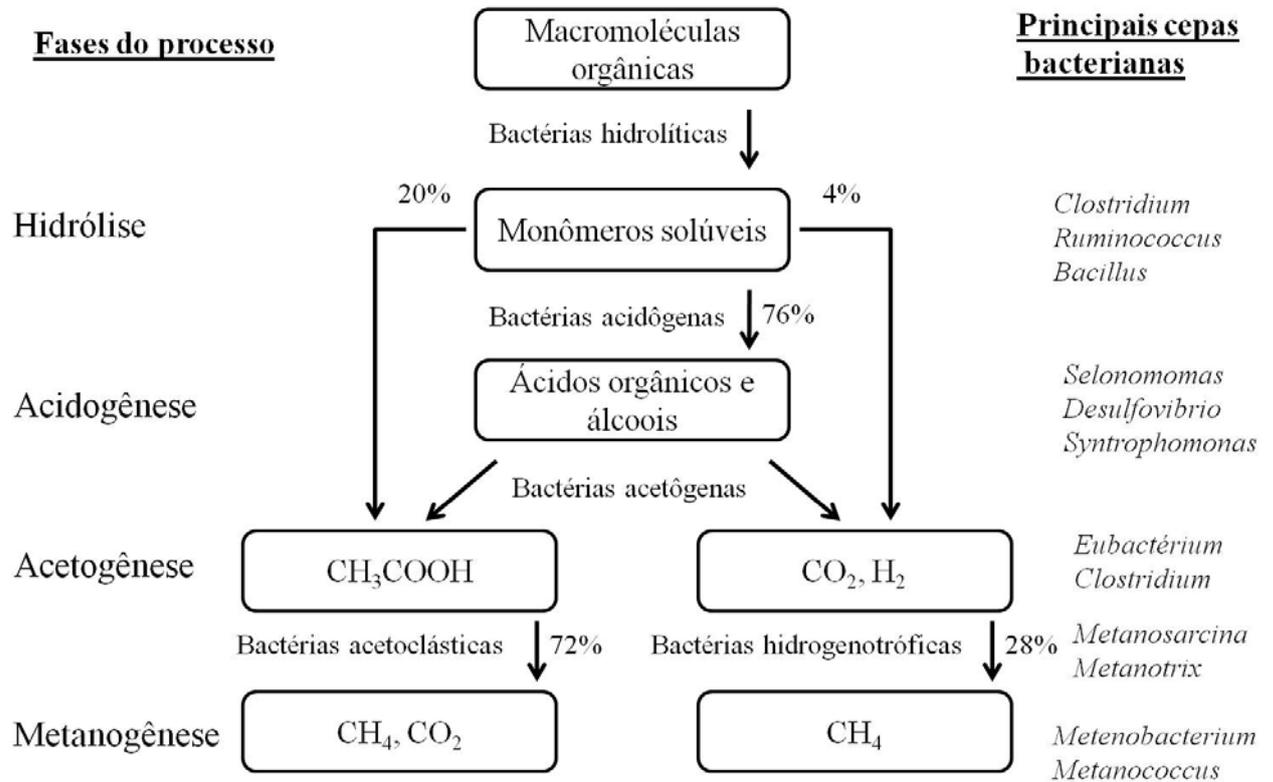
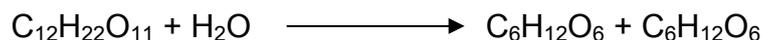


Figura 1 Esquema geral do processo de digestão anaeróbia (CECCHI, et al., 2005 modificado)

3.1 Hidrólise

Nesta primeira fase, o material orgânico complexo é convertido em compostos dissolvidos de menor peso molecular graças a três principais tipos de bactérias: as bactérias proteolíticas que produzem o enzima protease para degradar as proteínas e os peptídeos em amônia e aminoácidos, as bactérias lipolíticas que secernem o enzima lipase que degrada os lipídeos saponificáveis a ácidos graxos de cadeia longa de carbono (C15 a C17) e glicerol, e as bactérias celulolíticas que produzem o enzima hidrolase degradando os polissacarídeos a açúcares (JUANGA, 2005):



Assim, o material passa a ser disponível para o transporte dentro das células microbianas. O processo requer a interferência dos chamados microrganismos hidrolíticos, que mesmo com diferentes exigências de anaerobiose, são todos

anaeróbios facultativos. Outro importante papel desenvolvido pelas bactérias ativas na fase de hidrólise é o consumo do oxigênio presente no substrato, criando assim o ambiente ideal para a prossecução do processo de digestão anaeróbia e, em particular, para as bactérias metanogênicas, ativas na última parte do processo, que são anaeróbias estritas.

A velocidade com que o material é hidrolisado é diretamente relacionada com a disponibilidade de superfície de contato entre as bactérias e o substrato. Por isso, quanto menor a dimensão das partículas de substrato tanto maior será a velocidade da hidrólise (JUANGA, 2005).

A hidrólise é apontada por vários autores como gargalo do processo anaeróbio (VEEKEN et al., 2000; MATA-ALVAREZ, 2003; JUANGA, 2005) e também pode sofrer inibição por alguns fatores. Mata-Alvarez (2003) apontou que o acúmulo de aminoácidos e açúcares provoca um obstáculo a produção e a atividade das enzimas envolvidas na fase de hidrólise. Outra causa de inibição, pode ser o acúmulo de ácidos graxos voláteis não ionizados, responsável por sua vez de baixos níveis de pH ($\text{pH} < 5$) (DE BAERE et al., 1987; BRUMMELER; KOSTER, 1990).

3.2 Acidogênese

Nesta segunda fase, as bactérias acidogênicas transformam os produtos da primeira fase em ácidos graxos voláteis de cadeia curta de carbono, cetonas, álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio molecular. Os principais produtos da acidogênese são os ácidos propiônico, butírico, acético e láctico. Desses últimos, o ácido acético, bem como o CO_2 e o H_2 , não são envolvidos na fase sucessiva (acetogênese), sendo diretamente utilizados pelas bactérias metanogênicas na última fase do processo anaeróbio. Outro importante composto produzido nesta fase é o ácido sulfídrico (H_2S), resultante do metabolismo das bactérias redutoras de sulfatos, que utilizam esses últimos, bem como os sulfitos, como aceptores de elétrons. A presença de tais bactérias na digestão anaeróbia é indesejável, pois, além de entrarem em competição metabólica com as que produzem ácidos voláteis, são responsáveis pela produção de um gás que resulta corrosivo para todos os equipamentos metálicos com que o biogás entra em contato.

A seguir são ilustradas duas reações que tipicamente acontecem na fase de acidogênese, a conversão da glucose em etano e a conversão da glucose em ácido propiônico respectivamente (OSTREM, 2004).



3.3 Acetogênese

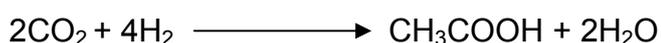
Mesmo se certa quantidade de ácido acético é produzida já na fase de acidogênese, a grande maioria dele é direta consequência do metabolismo das bactérias ativas na fase da acetogênese. É nesta fase que, a partir dos substratos produzidos na fase anterior (principalmente ácido propiônico e butírico) as bactérias acetogênicas produzem ácido acético, ácido fórmico, CO_2 e H_2 . Em particular, podem ser individuados dois grupos de bactérias acetogênicas que se diferem pelos substratos utilizados e pelos produtos do metabolismo.

O primeiro grupo é constituído pelas bactérias acetogênicas produtoras restritas de hidrogênio (OHPA) que produzem ácido acético, CO_2 e H_2 a partir dos principais ácidos graxos (ácidos propiônico e butírico) e álcoois, por meio do processo de β -oxidação. As bactérias OHPA também são muito importantes no processo de β -oxidação dos ácidos graxos com cadeia de carbono superior a 5 átomos de carbono, provenientes da hidrólise dos lipídeos e ainda são envolvidos na degradação anaeróbia dos compostos aromáticos (DUNCAN, 2003). Analisando o metabolismo das bactérias OHPA do ponto de vista termodinâmico, conclui-se que essas podem proliferar somente em um ambiente que tenha baixa concentração do H_2 por elas mesmas produzido. A conversão anaeróbia do ácido propiônico a acetato é, de fato, termodinamicamente mais difícil de ser concluída do que a de butirato, lactato ou etanol, tendo a reação um valor de energia livre de Gibbs igual a $+74\text{kJ/mol}$ (LI et al., 2012). Somente com uma pressão parcial de hidrogênio inferior a 10^{-4} atmosferas (MCCARTY; SMITH, 1986) o balanço de energia livre se torna positivo e a reação pode acontecer (OSTREM, 2004). Caso essa condição não seja satisfeita, o ácido propiônico irá se acumular causando uma queda no pH do meio

que por sua vez causa a parada do metabolismo de vários grupos de bactérias. As condições para que o metabolismo das bactérias OHPA aconteça de maneira ininterrupta, são mantidas graças a uma interação mútua, chamada sintrofia, entre elas e as bactérias removedoras de H₂ (metanogênicas hidrogenotróficas, redutoras de sulfatos e homoacetogênicas). As relações sintróficas, porém, são muito frágeis e qualquer pequena mudança nos equilíbrios metabólicos pode levar a excessiva presença de espécies inibidoras por uma das bactérias envolvidas na sintrofia. Em particular, as bactérias metanogênicas hidrogenotróficas são inibidas pelo excesso de ácidos graxos voláteis (substrato das bactérias OHPA) e as OHPA são inibidas pelo excesso de H₂ (substrato das metanogênicas) (DUNCAN, 2003).

Por isso, vários autores apontam que uma excessiva pressão parcial de H₂ tem a capacidade de inibir a produção de ácido acético (LYBERATOS; SKIADAS, 1999; OSTREM, 2004; JUANGA, 2005). Tal parâmetro também é utilizado para medir o bom estado do processo anaeróbio (MATA-ALVAREZ, 2003).

O segundo grupo é constituído pelas bactérias homoacetogênicas, anaeróbias estritas, que catalisam a formação de acetato a partir de H₂ e CO₂ segundo a seguinte reação:



As bactérias homoacetogênicas, como dito acima, são sintróficas, pois são envolvidas na transferência entre espécies bacterianas de H₂ que permite manter a pressão parcial de hidrogênio suficientemente baixa para que o metabolismo das bactérias OHPA aconteça sem interrupções. Porém, a importância das bactérias homoacetogênicas, nesse sentido, ainda não é totalmente clara, pois a concentração delas, tipicamente inferior a das bactérias metanogênicas hidrogenotróficas, sugere um papel menor no fenômeno da sintrofia (DUNCAN, 2005).

3.4 Metanogênese

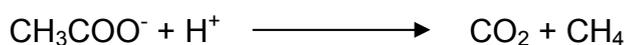
As bactérias envolvidas nessa fase, todas anaeróbias estritas, se destacam por não pertencer ao mesmo reino animal de todas as outras bactérias envolvidas

no processo (*Bacteria*). Elas foram, de fato, classificadas em um reino específico, o das *Archaea*. A ação das bactérias metanogênicas é fundamental aos fins da produção de metano a partir de acetato, CO₂ e H₂, sem elas, de fato, não ocorreria a degradação final da matéria orgânica por causa do acúmulo dos subprodutos das fases anteriores.

Geralmente a fase da metanogênese é considerada o passo que limita a velocidade do processo de digestão como um todo, embora à temperaturas abaixo dos 20°C a hidrólise possa se tornar também limitante (GUJER; ZEHNDER, 1983). Além disso, as bactérias metanogênicas são muito sensíveis a mudanças de pH, tendo um intervalo ótimo de desempenho entre pH 6,5 e 8,0. Isso pode se tornar um problema caso a capacidade tampão do meio seja insuficiente a contrastar a tendência a acidificação causada pelos produtos das fases acidogênica e acetogênica (DUNCAN, 2005).

As bactérias metanogênicas conseguem utilizar somente determinados substratos para o próprio metabolismo, em particular acetato, CO₂ e H₂. De acordo com o substrato utilizado, podem ser individuados dois grupos de bactérias ativas nessa fase.

O primeiro é constituído pelas bactérias metanogênicas acetoclásticas que produzem CH₄ a partir do ácido acético, formando CO₂ como fonte de elétrons para reduzir o radical metila a metano:



O ácido acético é considerado o maior precursor do metano produzido na digestão anaeróbia, sendo que 70% dele provem da reação supracitada. Mesmo assim, se conhecem somente 2 gêneros de bactérias metanogênicas que contém espécies em grau de utilizar o acetato como substrato (gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina*) (DUNCAN, 2005). As bactérias do primeiro grupo são as mais sensíveis a mudanças de pH do meio, pois isso influencia diretamente a forma em que o ácido acético se encontra disponível. Se o ácido acético encontra-se na forma não dissociada pode atravessar a membrana celular das bactérias que são, assim, em grau de utilizá-lo para o metabolismo. Essa condição verifica-se somente em um

intervalo de pH relativamente pequeno, entre pH 6,0 e 8,0. Em caso de pH superior, o ácido acético estará presente principalmente em forma de acetato (CH_3COO^-) e a concentração da forma não dissociada no meio não será suficiente a criar um gradiente para que ele atravesse a membrana bacteriana. Ao contrário, caso o pH do meio seja relativamente baixo (entre pH 5,0 e 6,0), haverá um excesso de ácido acético em forma não dissociada que atravessa as membranas celulares inibindo o metabolismo das bactérias por excesso de substrato (CECCHI et al., 2005).

No segundo grupo, são classificadas as chamadas bactérias metanogênicas hidrogenotróficas, responsáveis pela produção de cerca de 30% do metano da digestão anaeróbia. Essas bactérias conseguem reduzir principalmente CO_2 , mas também formiato, metanol e metilaminas, utilizando o H_2 produzido pelas bactérias hidrolíticas e acidogênicas, segundo a seguinte reação:



3.5 A etapa limitante

Como observado, a digestão anaeróbia é um processo que envolve diferentes grupos de bactérias que se inter-relacionam e convivem em um ambiente onde o produto metabólico de um grupo é o substrato de outro. Neste ecossistema, o equilíbrio entre os grupos de bactérias é fundamental para o sucesso da digestão anaeróbia. Portanto, para a otimização do processo, os fatores ambientais devem ser apropriados para todas as espécies participantes, sendo as *Archaeas* metanogênicas aquelas de maior exigência. Condições ambientais de pH em torno de 7, temperatura na faixa mesofílica (entre 20 e 40°C) e ambiente anaeróbio estrito, são condições conhecidas como ótimas para o processo (TAKEMOTO, 2006).

A digestão anaeróbia é um processo que se desenvolve em várias etapas e como todos os processos desse tipo também tem uma fase que pode ser definida como limitante ou gargalo e que, sendo a que acontece de forma mais demorada, acaba limitando o processo inteiro (LYBERATOS; SKIADAS 1999).

A determinação de qual seja a etapa que constitui o gargalo do processo anaeróbio foi objeto de estudo de diversas publicações (NOIKE, et al. 1985; LYBERATOS; SKIADAS 1999; VEEKEN et al., 2000; MATA-ALVAREZ, 2003),

porém, devido as diferentes condições operativas, características dos substratos utilizados, temperaturas, etc., tem-se diferentes conclusões sobre o assunto (LYBERATOS; SKIADAS 1999). Contudo, percebe-se que, em caso de substratos onde a matéria orgânica esteja presente em forma de moléculas menores e mais simples, a metanogênese é apontada mais frequentemente por ser a etapa limitante. Ao contrário, quando os substratos são ricos em macromoléculas complexas, a etapa limitante passa a ser a hidrólise.

De acordo com quanto dito acima, Mata-Alvarez (2003) aponta que em caso de águas residuais, a metanogênese é comumente apontada como a fase que limita a velocidade do processo anaeróbio, mas em caso de materiais complexos, como os resíduos sólidos, a acessibilidade do substrato pelas bactérias hidrolíticas e a hidrólise das macromoléculas orgânicas constituem as etapas limitantes.

No mesmo sentido, Eastman e Ferguson (1981) afirmam que a fase limitante na digestão anaeróbia de resíduos sólidos é a hidrólise das moléculas complexas em substratos solúveis. Além disso, o fato dos produtos da hidrólise não se acumularem em nenhuma condição operacional, indica que a cinética do inteiro processo de digestão anaeróbia é determinada pela velocidade da hidrólise.

Em particular, Novak, Sadler e Murthy (2003) afirmaram que durante a hidrólise verifica-se uma diminuição da atividade das enzimas produzidas pelas bactérias hidrolíticas ao longo do tempo, mais ou menos marcada dependendo do tipo de enzima, provavelmente devido a degradação que as mesmas sofrem durante a digestão anaeróbia. Esse fenômeno se configura então como limitador do processo como um todo, bem como da produção final de biogás. Isso também faz o processo de digestão anaeróbia se caracterizar por ter TRH elevado (tipicamente entre 20 e 30 dias) e baixa eficiência na remoção da fração orgânica de sólidos (entre 30 e 50%).

Para limitar esse fenômeno, aumentando a taxa de hidrólise, foram estudados vários tipos de pré-tratamentos da biomassa, com o objetivo de converter as macromoléculas orgânicas de lenta degradação em compostos com menor peso molecular e mais facilmente degradáveis (APPELS, 2008). Os métodos de pré-tratamento podem ser de tipo térmico, mecânico, químico e biológico. Porém, os

métodos biológicos, entendidos como adição de microrganismos ou enzimas ao meio de reação, se caracterizam por apresentar algumas vantagens:

- Em caso de pré-tratamento térmico ou mecânico há equipamentos adicionais a serem instalados (queimadores, moinhos entre outros). Os pré-tratamentos biológicos não precisam de equipamentos adicionais.
- Grande parte dos pré-tratamentos químicos precisam alcançar condições extremas de pH, pressão ou temperatura para terem um efeito significativo. Isso obriga a efetuar tais pré-tratamentos em espaços ou tanques separados e frequentemente a recondicionar o material (neutralização, resfriamento) antes que seja submetido a digestão anaeróbia. Os pré-tratamentos biológicos não alteram nenhum dos parâmetros supracitados.
- A realização dos pré-tratamentos biológicos é, na maioria dos casos, extremamente simples e sem risco algum para o operador, podendo ser realizada por pessoas sem treinamento específico.

3.6 Pré-tratamentos enzimáticos

A adição de enzimas ao sistema de tratamento anaeróbio tem sido estudada, pois pode suplementar a natural diminuição da atividade enzimática e ajudar na degradação dos biopolímeros que formam a matéria orgânica, liberando uma maior quantidade de nutrientes para o crescimento dos microrganismos, melhorando também eventuais pós-tratamentos de secagem do material (AYOL, 2005).

Utilizando uma mistura de enzimas carbohidrase, protease e lipase na proporção de 1:2:1 respectivamente, adicionada em 0,2% de volume a um complexo de restos alimentares, com DQOS de 91g l^{-1} e conteúdo de ST de 18,5%, Moon e Song (2011) conseguiram alcançar uma redução da demanda química de oxigênio solúvel do 95%.

Valladão, Freire e Cammarota (2007) testaram um processo de pré-hidrólise enzimática sobre efluentes de matadouro de aves, tendo DQO igual a 1181mg l^{-1} e conteúdo de ST de 0,3%, a aplicando uma dose de 0,1% em volume de uma mistura

de lipase ($21,4\text{Ug}^{-1}$) e protease ($2,7\text{Ug}^{-1}$) por 22 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo 85% de remoção da DQO.

Sobre a hidrólise enzimática do lodo de tratamento de esgoto tem-se uma ampla literatura, pois as substâncias nutritivas presentes nesse substrato, contidas nas células microbianas que constituem o lodo, são dificilmente utilizáveis pelas bactérias anaeróbias. O objetivo dos pré-tratamentos do lodo de tratamento de esgoto é, então, a quebra das membranas celulares das células microbianas, assim que o conteúdo delas seja disponível para o metabolismo das bactérias anaeróbias.

Yang et al. (2010) estudaram os efeitos sobre a hidrólise de dois preparados comerciais de enzimas α -amilase e protease. A mistura dos preparados, em proporção de 1:3, adicionada ao lodo de tratamento de esgoto em quantidade igual ao 6% de ST, tendo um conteúdo de SST de 0,8% e SSV de 0,5% em um pré-tratamento de 4 horas a 50°C , proporcionou redução de SSV do 68,43%.

Roman, Burgess e Pletschke (2006) adicionando uma mistura de celulase e protease a lodo de tratamento de esgoto em proporção de 0,03% em volume, obtiveram um aumento de redução dos ST de 60% e uma redução da DQO do 95%.

Donoso-Bravo e Fdz-Polanco (2013) estudaram o efeito da adição de enzima lipase ao lodo de tratamento de esgoto misturado com 2, 5 e 10% em volume do material prelevado da fase de separação da gordura. Ao material assim preparado foi adicionado enzima em 4 doses diferentes (0,25; 0,33; 0,83 e 1,67% do volume do substrato) e em todos os testes registou-se relevante aumento de produção de biogás. Em particular, a tese com adição de 5% de gordura e 0,33% de lipase foi a que mais se destacou, com um incremento de 130% de biogás produzido.

Também quando o substrato a ser biodigerido é em boa parte constituído por substâncias orgânicas recalcitrantes, como celulose ou hemicelulose, o potencial de produção de biogás pode ser significativamente aumentado com os tratamentos enzimáticos.

Um estudo conduzido por Bochmann et al. (2007), sobre a digestão anaeróbia de cereais usados para fabricação de cerveja, demonstrou como uma pré-hidrólise enzimática do substrato, utilizando um produto multi-enzimático obtido com uma fermentação em estado sólido, aumentou a qualidade do biogás produzido. O biogás

resultou ter um maior teor de CH₄ e teores menores de CO₂ e H₂S em comparação ao biogás produzido pelos cereais não tratados com a enzima.

Angelidaki e Ahring (2000) aplicaram um pré-tratamento a fibras separadas do esterco bovino com a bactéria B4 que degrada hemicelulose. A bactéria foi cultivada em substrato de xilana e, alcançada a fase de crescimento exponencial, foi centrifugada e 1mL do concentrado foi adicionado às fibras. As fibras foram incubadas por 7 dias a 70°C. Isso proporcionou um incremento na produção de metano de 30%, em comparação às fibras não tratadas, quando essas foram utilizadas em digestão anaeróbia.

A adição de enzimas ou microrganismos aos sistemas de digestão anaeróbia apresenta-se então como uma tecnologia promissora e flexível, podendo ser aplicada com sucesso no tratamento de diferentes substratos. Porém, o número de estudos disponíveis em revistas internacionais sobre a adição de enzimas a substratos zootécnicos é exíguo. Na literatura nacional, em particular, não foi possível encontrar nenhum trabalho publicado sobre o assunto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, localizada em Jaboticabal - SP. O local encontra-se a cerca de 600m sobre o nível do mar, o clima da região é subtropical úmido, seco no inverno e com chuvas no verão, com precipitação anual média de 1.424,6mm e temperatura média anual de 22,2°C, umidade relativa média anual de 70,8%, segundo os registros da Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da referida Faculdade, no período de 1971 a 2000.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biodigestão Anaeróbia do Departamento de Engenharia Rural, com os dejetos coletados de bovinos de corte e de suínos, ambos pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal.

4.2 Tratamentos

O Microsource[®] “S” é um ativador biológico (probiótico) composto de microrganismos selecionados, porém não propositalmente desenvolvido para aumentar a produção de biogás em digestores anaeróbios. Segundo as informações do site da empresa, o produto, adicionado às rações, auxilia na gestão dos resíduos zootécnicos da suinocultura acelerando a decomposição, reduzindo o mau cheiro (ácidos graxos voláteis, NH₃ e H₂S), a quantidade de sólidos e auxiliando também na fase de limpeza das baias (DSM, 2005). Justamente por essas características e pela ação que promete desenvolver sobre os dejetos suínos, julgou-se o Microsource[®] “S” interessante para ser incluído na experimentação.

O outro ativador biológico é, como dito acima, uma mistura de alguns microrganismos (*B. subtilis*, *B. firmus* e *B. licheniformis*) e enzimas (lipase, protease e lactase). Tal produto foi considerado interessante, para os fins da pesquisa, por conter enzimas e bactérias produtoras de outras enzimas. Em particular, o *B. subtilis* é uma bactéria Gram-positiva, comumente presente nos pastos, nas forragens e também no solo. Caracteriza-se por produzir a enzima subtilisina que pertence a

classe das hidrolases, com ação proteolítica. O *B. firmus* é uma bactéria Gram-positiva com capacidade de hidrolisar amido e reduzir nitratos e nitritos (GORDON, HYDE, MOORE 1977). *B. licheniformis* é uma bactéria Gram-positiva, frequentemente encontrada na plumagem dos pássaros e, por isso, estudada pela capacidade de degradar tal material. Também é utilizada em produtos de limpeza para produzir uma protease resistente a pH muito altos.

4.3 Delineamento experimental

O experimento foi dividido em duas fases: a primeira teve o objetivo de identificar qual tratamento (produto e dose) iria proporcionar o maior aumento de produção de biogás para cada dejetos (bovinos de corte e suínos). Na primeira fase cada um dos dois produtos foi testado em 2 doses diferentes, a dose sugerida pela empresa fabricante (500g/t de dejetos e 10ppm, respectivamente para o Microsource® “S” e para a mistura) e o dobro da dose, para cada dejetos (bovino de corte e suíno). O delineamento experimental foi então inteiramente casualizado em esquema fatorial (1 dejetos * 2 produtos * 2 doses * 3 repetições + 1 controle por dejetos * 3 repetições = 15 digestores) (Tabela 1). Os digestores utilizados na primeira fase do experimento foram do tipo “batelada” (Figura 2).

Tabela 1 - Representação esquemática do delineamento experimental da primeira fase (cada tratamento teve 3 repetições).

BC	BM1	BM2	BA1	BA2
SC	SM1	SM2	SA1	SA2

BC Bovino controle; BM1 Bovino com Microsource® “S” 500g/t; BM2 Bovino com Microsource® “S” 1000g/t; BA1 Bovino com mistura 10ppm; BA2 Bovino com mistura 20ppm; SC Suíno controle; SM1 Suíno com Microsource® “S” 500g/t; SM2 Suíno com Microsource® “S” 1000g/t; SA1 Suíno com mistura 10ppm; SA2 Suíno com mistura 20ppm;

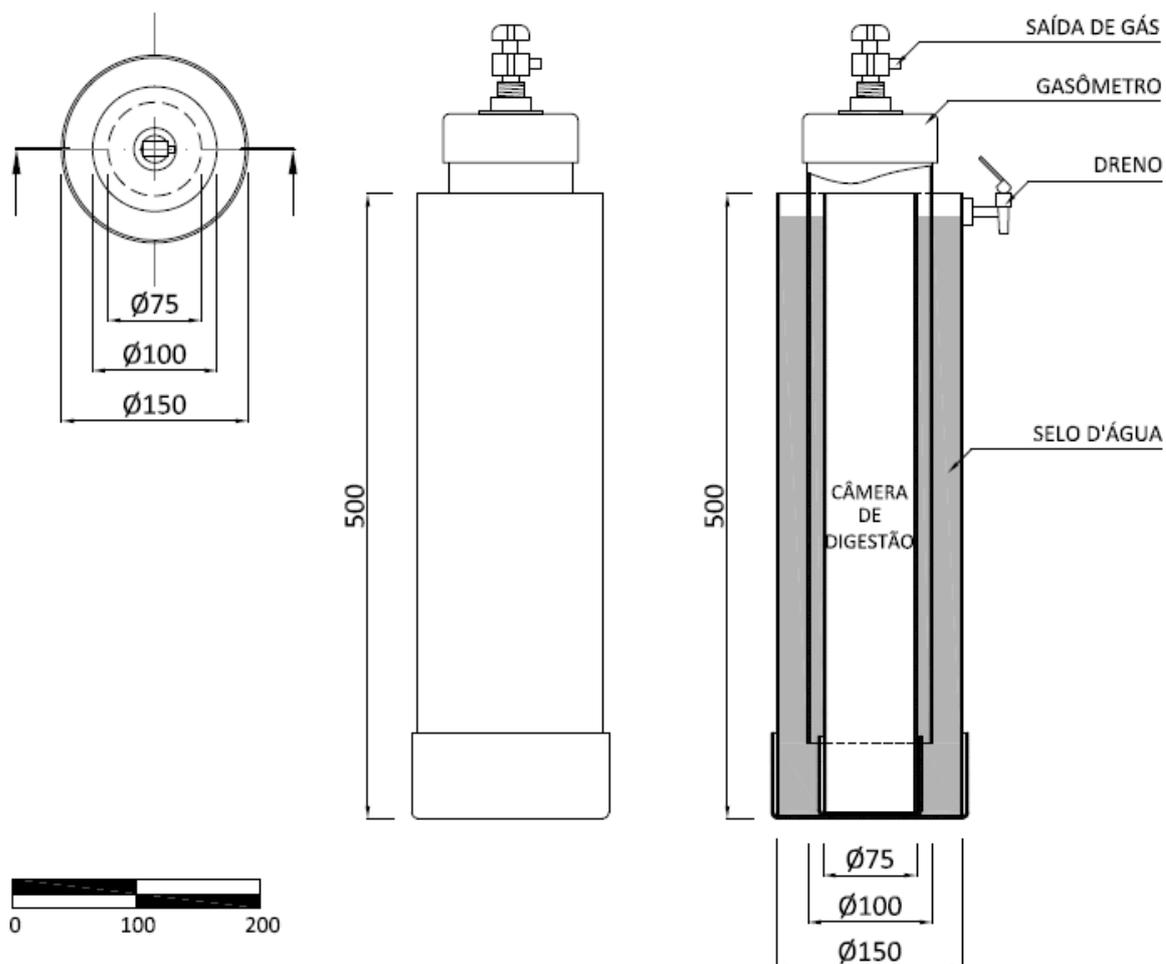


Figura 2 – Vista superior, vista frontal e corte de um digester batelada, medidas em mm.

A segunda fase consistiu em aplicar o tratamento selecionado em digestores anaeróbios de tipo contínuo (Figura 3), com o objetivo de monitorar o comportamento dos produtos em uma situação que mais se aproximasse da realidade.

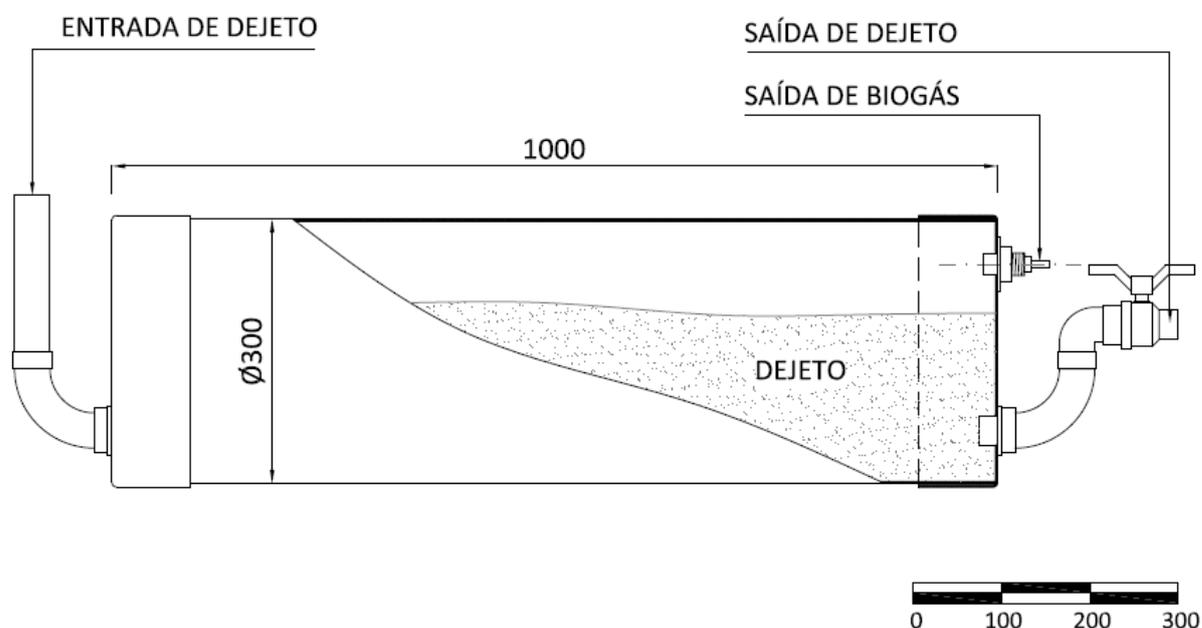


Figura 3 – Corte de um digester contínuo, medidas em mm.

O delineamento experimental da segunda fase também foi inteiramente casualizado em esquema fatorial: 2 doses * 2 dejetos, com 3 repetições.

4.4 Metodologia

Os digestores batelada são constituídos por três cilindros retos de PVC com diâmetros de 7,5, 10 e 15cm, acoplados sobre um cap de PVC, com capacidade operacional máxima de 2 litros de substrato em fermentação cada. Os cilindros de 10 e 15cm encontram-se inseridos um no interior do outro, de forma que o espaço existente entre a parede externa do cilindro interior e a parede interna do cilindro exterior comporta um volume de água (“selo de água”), atingindo profundidade de 50cm. O cilindro de diâmetro intermediário tem uma das extremidades vedadas, conservando-se apenas uma abertura para descarga do biogás, e está emborcado no selo de água, para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido (ORRICO; ORRICO; LUCAS Jr, 2011).

Após a montagem, os equipamentos foram devidamente testados (para verificar a eventual presença de vazamentos de gás ou líquidos) e, em seguida, foram coletados e caracterizados os dejetos alvo do experimento: dejetos de bovinos de corte e de suínos, ambos obtidos nos respectivos setores pertencentes ao

Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Os suínos eram leitões com 70 dias de idade, alimentados com uma dieta a base de milho e soja integral torrada, além de fosfato bicálcico, calcário, sal, vitaminas, lisina e metionina. Os animais eram alojados numa baia coletiva coberta, com piso concretado, com cocho de alimentação na frente (acessível pelo corredor de serviço) e bebedouro do lado oposto (Figuras 4 e 5). O dejetos foi coletado com um pá da maneira mais homogênea possível, prelevando o que estava compactado no piso bem como o que se encontrava próximo do bebedouro e estava mais úmido. Materiais que se encontravam misturados ao dejetos como restos de comida ou pelos não foram separados.



Figura 4 - Vista parcial da área onde foram coletados os dejetos suínos.



Figura 5 - Detalhe da área próxima ao cocho.

Os bovinos eram alimentados com silagem de milho e cana de açúcar picada não hidrolisada nas proporções respectivamente de 85% e 15%. Os animais eram alojados em baias individuais cobertas, com piso concretado inclinado, de maneira que os dejetos (fezes e urina) escorressem por fora das baias (Figuras 6 e 7). Os dejetos (fezes e urina misturados) foram coletados com uma pá, procurando prelevar tanto material que se apresentava visivelmente mais fresco (coloração mais clara e maior conteúdo de umidade) quanto material aparentemente menos fresco. Pela

proximidade com superfícies de terra e vegetação, provavelmente, pequenas quantidades desses materiais misturaram-se com os dejetos.



Figura 6 - Vista parcial das baias dos bovinos de corte e da cobertura.



Figura 7 – Detalhe da área onde foi efetuada a coleta dos dejetos dos bovinos de corte.

Do material coletado foram executadas análises de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), cinzas (CZ), pH, alcalinidade e acidez segundo os métodos descritos por APHA (2005). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Características dos dejetos utilizados para composição dos substratos (as análises de ST, SV e CZ foram efetuadas sobre o material bruto, as restantes, sobre o material diluído).

	ST¹	SV²	CZ³	pH	Alcalinidade	Acidez
	[%]	[%ST]	[%ST]		[mg CaCO ₃ /L]	[mg CaCO ₃ /L]
Dejeto bovino	21,84	66,71	33,29	8,00	2760	850
Dejeto suíno	27,97	63,06	36,94	5,31	2040	3500

¹sólidos totais. ²sólidos voláteis. ³cinzas.

Sabendo-se qual o percentual de ST no material bruto foi possível calcular a diluição necessária para que se obtivessem os conteúdos de ST nos digestores batelada próximos de 4%.

Tal diluição foi escolhida pensando nas condições reais de operação de um digestor anaeróbio alimentado com dejetos animais, onde são utilizadas percentuais de ST próximas a tal valor. Outro fator que pesou na escolha da diluição a ser aplicada foi o emprego, na segunda fase do experimento, dos digestores contínuos. Um conteúdo de ST maior, aumentando a densidade do material, iria causar problemas nas operações diárias de carga e descarga, provocando entupimentos.

Levando-se em conta que cada digestor batelada tem um volume útil de 1800mL, considerou-se como capacidade útil 1800g, calculando-se então as seguintes diluições:

Bovino corte: 555g dejetos + 1245g água.

Suíno: 389g dejetos + 1411g água.

O cálculo das quantidades dos produtos ativadores que foram adicionados seguiram as indicações das empresas fabricantes, sendo que para o Microsource[®] “S” a dose é de 500g por tonelada de dejetos e para a mistura é de 10ppm. Foram então determinadas a dose recomendada e o dobro da dose iguais a 2,7g e 5,4g para o Microsource[®] “S” e 0,054g e 0,108g para a mistura, aplicadas nos respectivos tratamentos.

Os componentes do substrato e os produtos enzimáticos foram pesados, respectivamente, em uma balança Toledo 9094c/5 e em uma balança Shimatzu AY220 e colocados no interior dos digestores. Os digestores, assim preparados, foram colocados na área externa do laboratório de digestão anaeróbia do Departamento de Engenharia Rural da FCAV, em bancada construída em madeira para facilitar as operações de medição da produção de biogás (Figura 8).



Figura 8 – Vista parcial dos digestores batelada.

Esta primeira fase do experimento foi planejada inicialmente para durar 70 dias. Porém, após algumas semanas, ficou evidente que os digestores alimentados com dejetos suínos não apresentavam o desempenho esperado. As produções de biogás dos biodigestores abastecidos com os dejetos de suínos eram muito baixas ou iguais a zero, indicando uma provável acidificação do meio. Essa foi a principal razão que determinou a prorrogação do prazo de 70 para 150 dias, dando assim um tempo a mais para o processo se estabilizar nos digestores com dejetos suínos. Mesmo assim, não houve melhora significativa no desempenho e na produção de biogás e, vencido o prazo de 150 dias, três biodigestores, escolhidos aleatoriamente, foram abertos para se coletar amostras e analisá-las. Foi suficiente medir o pH, que resultou estar na faixa entre 5,0 e 5,5, para se confirmar a hipótese de que a grande quantidade de nutrientes disponíveis para a fermentação, junto à alta acidez, ao baixo pH inicial e a baixa temperatura média do ambiente (22,3°C) nos primeiros 70 dias de experimento, induziram uma rápida acidificação do meio interrompendo o processo de digestão anaeróbia. Isso de fato inviabilizou todos os dados coletados nos tratamentos com os dejetos de suínos e obrigou a repetir os ensaios com estes dejetos.

Quando a primeira fase do experimento com os dejetos bovinos terminou, ainda não se dispunha dos dados com os dejetos de suínos (repetição dos ensaios) para se executar uma análise estatística e se tomar uma decisão sobre qual

tratamento aplicar-se-ia à segunda fase. Por causa dos atrasos ocorridos na fase de construção e teste dos equipamentos também não houve a possibilidade de esperar. Decidiu-se, portanto, aplicar aos dejetos de suínos, na fase de operação contínua, o mesmo tratamento que seria aplicado aos dejetos bovinos. Assim decidiu-se testar o Microsource[®] “S” na dose padrão também com os dejetos suínos.

A segunda fase do experimento consistiu na construção e operação ao longo de 90 dias de 12 biodigestores contínuos (Figuras 9 e 10) abastecidos diariamente com uma mistura de água e dejetos, para os tratamentos controles, e de água, dejetos e Microsource[®] “S”, para os demais tratamentos.



Figura 9 – Vista parcial dos digestores contínuos.



Figura 10 - Detalhe do cano de saída e do gasômetro.

Cada digestor contínuo é constituído de um cilindro reto de PVC com diâmetro de 30 cm cujas extremidades são vedadas por 2 caps de PVC do mesmo diâmetro. No cap dianteiro foram feitos 2 furos a fim de colocar, com o auxílio de flanges rosqueadas, a saída do biogás que liga o digestor ao gasômetro e o cano de saída do material biodigerido. No cap traseiro também foi feito um furo para colocação do cano de entrada, através do qual o digestor pode ser abastecido. O gasômetro, que nos digestores batelada encontra-se integrado na estrutura do próprio digestor, neste caso é separado, constituído por 2 canos retos de PVC com diâmetros de 25 e 30cm (Figura 11). Cada cano tem uma extremidade vedada com um cap de PVC do

diâmetro correspondente e encontram-se inseridos um dentro do outro. O cano de diâmetro maior é cheio com água de maneira a formar um selo d'água e o de diâmetro menor está emborcado no selo d'água, para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido.

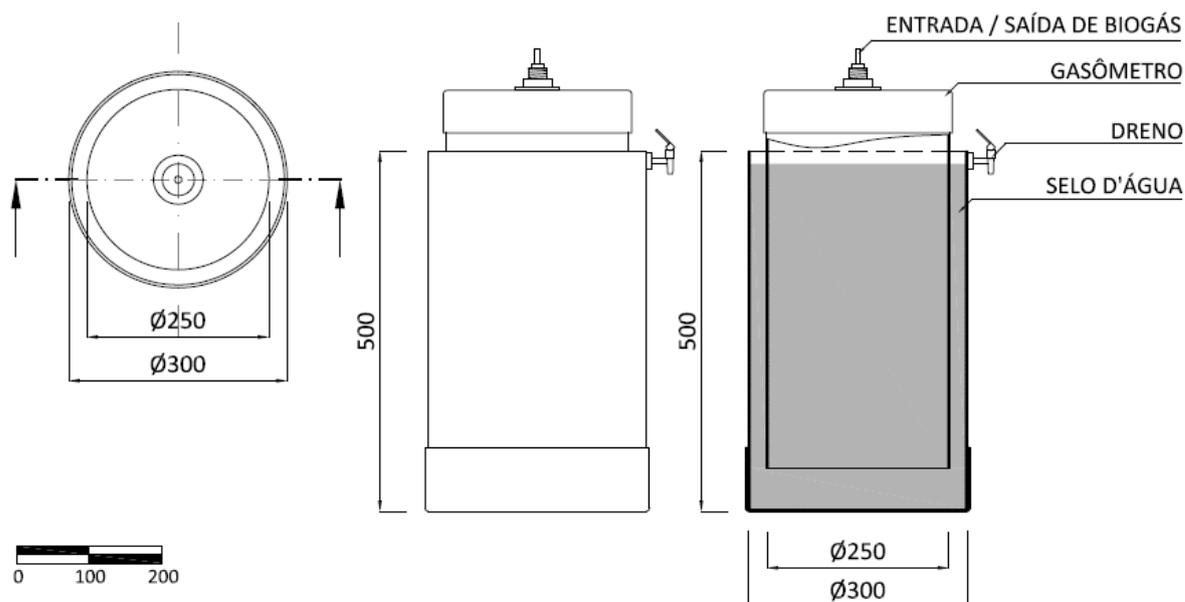


Figura 11 - Vista superior, vista frontal e corte de um gasômetro contínuo.

A quantidade de ST nos digestores foi mantida no nível de 4% e o TRH foi de 30 dias. Assim que os biodigestores ficaram prontos para a operação, foi executada a fase de “partida” dos mesmos. Esta fase é necessária para permitir que a flora microbiana anaeróbia se adapte à biomassa a ser degradada. Para isto, os biodigestores foram abastecidos com 10 litros de “inóculo” (material estabilizado vindo de outros experimentos de biodigestão, rico em microrganismos) e 50 litros de dejetos diluídos em água para se obter um teor de ST próximo a 4% e, em seguida, foi monitorada a qualidade do biogás produzido com o “método da queima”. Tal método consiste em verificar a capacidade de queima do biogás em um bico Bunsen (Figura 12) para se determinar, de maneira rápida, quando é alcançado um percentual de metano que permita a queima do biogás.



Figura 12 - Teste de queima do biogás.

O biogás, de fato, queima quando o metano representa cerca de 50% do volume, o que também é sinal de que a flora microbiana se desenvolveu nas proporções certas para que o processo anaeróbio aconteça da forma desejada. A queima do biogás foi, portanto, adotada como sinal para iniciarem os abastecimentos diários dos biodigestores. A fase de partida durou em total 15 dias, sendo que, depois de uma semana, o biogás produzido pelos dejetos bovinos já estava queimando, porém o produzido pelos dejetos suínos precisou de 2 semanas para alcançar tal requisito.

As operações diárias dos digestores contínuos foram divididas em três fases. Em primeiro lugar era medida a produção de biogás de cada digestor com o mesmo método descrito para os digestores batelada. Em segundo lugar preparava-se a carga (2L por digestor) com o auxílio de uma balança Toledo 9094c/5, misturando dejetos, água e Microsource® “S”, mantendo-se sempre os teores de ST próximos de 4%. A mistura era preparada e utilizada diariamente, para ter maior garantia das quantidades de ST e SV colocados nos biodigestores. Por último era efetuada a retirada da mesma quantidade que era carregada a cada dia, mantendo-se assim o volume dos dejetos constante no interior dos biodigestores.

Nesta segunda fase do experimento os digestores abastecidos com dejetos suínos apresentaram novamente aqueles sinais de mau funcionamento e acidificação ilustrados anteriormente. De fato, durante o primeiro mês, a produção de biogás foi muito baixa ou até nula, o conteúdo de metano inferior a 50% e o pH

do material digerido inferior a 6. Assim, decidiu-se interromper as cargas diárias nos biodigestores que eram abastecidos com dejetos de suínos para que a flora microbiana eliminasse o excesso de acidez e recuperasse a estabilidade do processo. As cargas diárias recomeçaram duas semanas após a interrupção, sendo que na primeira semana de carga os digestores foram abastecidos somente com a metade do volume da carga normal (1L de dejetos). Em seguida, os biodigestores com dejetos de suínos apresentaram desempenho bem melhor, com uma produção de biogás satisfatória e conteúdos de metano acima de 50%.

4.5 Parâmetros medidos

Na primeira fase do experimento o volume de biogás produzido por cada digestor foi determinado medindo-se com uma régua a distância entre a borda inferior do cap do gasômetro e o “selo d’água” (Figura 2) e multiplicando-se tal medida pela área da seção transversal interna dos gasômetros. Após cada leitura, o volume do gás foi “zerado” esvaziando-se o gasômetro. A cada leitura também foi medida a temperatura do ambiente para se efetuar a correção (normalizar) o volume de biogás segundo a fórmula sugerida no VDI4630 (2006). A análise do gás foi feita com frequência semanal, para determinar os teores de metano (CH_4) e dióxido carbono (CO_2), em cromatógrafo de fase gasosa Finigan GC-2001, equipado com as colunas Porapack Q, peneira molecular, e detector de condutividade térmica.

Durante a primeira fase do experimento as análises de ST, SV, CZ, alcalinidade, pH e acidez, foram executadas somente a fim de caracterizar o material e calcular a diluição necessária para que o conteúdo de ST fosse cerca de 4%. Os parâmetros regularmente medidos, como citado anteriormente, foram altura do gasômetro, temperatura do ambiente e porcentual de CH_4 . A partir deles foram calculados os parâmetros que refletem o desempenho e são considerados nas análises estatísticas, ou seja: produção específica de biogás (PEB em NmL/gSV) que representa o desempenho do ponto de vista quantitativo e porcentual média de metano (PMM em %) representado o desempenho do ponto de vista qualitativo.

Na segunda fase do experimento os parâmetros medidos, para calcular e caracterizar do ponto de vista qualitativo o volume de biogás produzido, foram os mesmos da primeira fase.

Nesta fase foram executadas também análises sobre os materiais em entrada e saída dos digestores, ao fim de determinar com precisão os fluxos de ST e SV e, com as análises de pH, alcalinidade e acidez, monitorar as condições do ambiente anaeróbio.

As análises dos materiais que entravam e saíam dos digestores foram feitas com frequência determinada, para monitorar o andamento do processo anaeróbio ao longo do tempo, podendo-se, desta maneira, detectar os efeitos dos tratamentos assim como eventuais problemas. Para efetuar as cargas diárias era mantido um estoque de dejetos, logo as análises do material em entrada foram feitas conforme o estoque precisava ser repostado. O material em saída foi analisado com maior frequência. Em particular, as análises efetuadas e as frequências foram ST, SV, CZ (durante a primeira semana de carga, diariamente, em seguida, semanalmente); pH (semanalmente); Alcalinidade e acidez (cada 15 dias).

A composição do biogás produzido foi determinada semanalmente com o mesmo equipamento utilizado para os digestores batelada. Os parâmetros calculados que refletem o desempenho e são considerados nas análises estatísticas da segunda fase do experimento, são os mesmos ilustrados para a primeira fase (PEB e PMM), a única diferença, por causa do maior volume de biogás produzido, é o emprego de litros no lugar de mililitros como medida de volume.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas duas fases do experimento os parâmetros avaliados foram os mesmos, porém houve diferença nas frequências de avaliação bem como no significado que os parâmetros têm a respeito de cada fase. Por isso, os resultados experimentais e estatísticos são aqui ilustrados de maneira separada por fase.

5.1 Dejeito bovino – Fase 1

Os digestores batelada abastecidos com dejeito bovino tiveram um desempenho geral conforme o esperado, alcançando rapidamente e mantendo um teor porcentual de metano acima de 50% e produzindo volumes de biogás por grama de SV adicionado a cada vez maiores, até atingir um pico, para depois diminuir rapidamente (Figura 13).

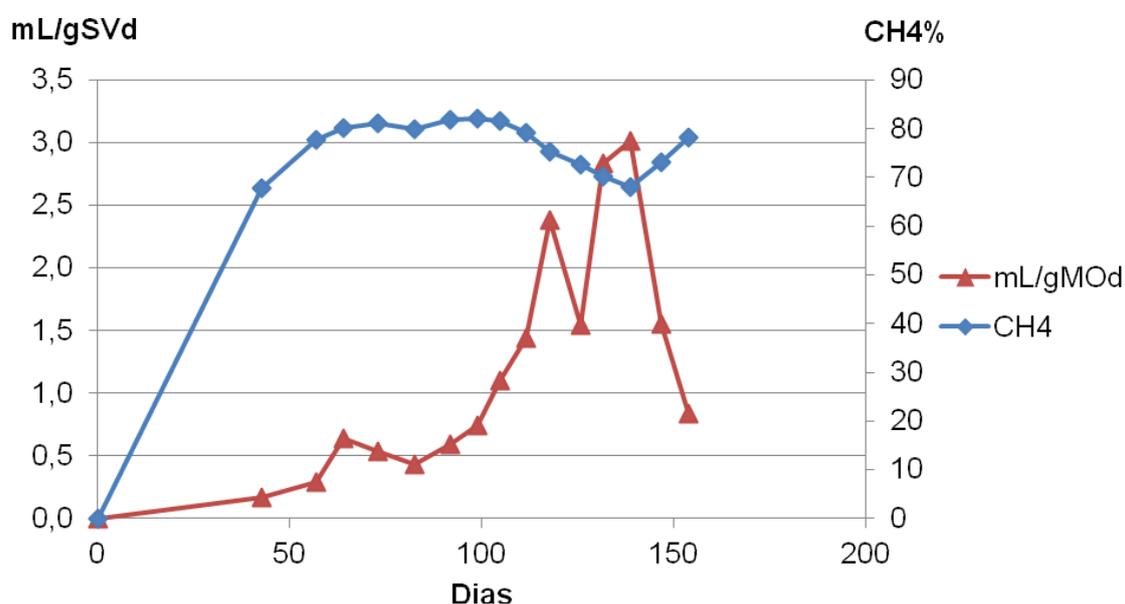


Figura 13 - Desempenho dos digestores batelada abastecidos com dejeito bovino.

O pico de produção específica, que representa a fase de hidrólise e se caracteriza por uma maior produção de CO_2 , porém, apresentou-se somente no final do experimento. Tal fenômeno foi devido à baixa temperatura média ambiental ($22,3^\circ\text{C}$) que manteve-se nos primeiros 70 dias e que fez a hidrólise proceder mais lentamente do que o esperado (CIRNE, et al., 2007), causando um atraso no inteiro

processo de digestão. A produção específica total de biogás, porém, pode ser considerada satisfatória, sendo inferior, mas comparável a aquela encontrada por Meneses (2011) que trabalhou com digestores batelada em ambiente fechado.

A execução da análise estatística foi feita em duas partes. Na primeira, para verificar as condições necessárias a uma correta análise da variância, foram examinadas a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e a presença de dados outlier. Não detectando incongruências, passou-se para a segunda fase, cujos resultados, são ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise da variância da PEB (dejeito bovino).

Fonte de variação	GL¹	SQ²	QM³	F⁴	p⁵
Controle	1	995,778815	995,778815	2,53	0,1425
Doses	1	870,962962	870,962962	2,22	0,1674
Produtos	1	152,588789	152,588789	0,39	0,5471
Doses*Produtos	1	1557,763780	1557,763780	3,96	0,0745
Erro	10	3929,498392	392,949839		
Total	14	7506,592739			

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor

De acordo com o teste F, não foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, entre nenhum dos fatores que constituem os tratamentos, com relação a PEB. Foi aceita, portanto, a hipótese nula H_0 , ou seja, não há diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e o controle.

Por ser um experimento fatorial com fatores aninhados, continuou-se a análise estatística da PEB confrontando o efeito de cada nível do fator Dose dentro de cada nível do fator Produto (Tabela 4 e Tabela 5).

Tabela 4 - Análise estatística da PEB do fator Produto dentro do fator Dose.

Fonte de variação	GL¹	SQ²	QM³	F⁴	p⁵
Dose 1	1	1342,718375	1342,718375	3,42	0,0943
Dose 2	1	367,634195	367,634195	0,94	0,3562

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor

Os dados mostram que dentro do fator Dose, nenhum nível do fator Produto se destacou por ter tido um desempenho significativamente diferente dos outros. Pode-se então concluir que não há diferenças estatisticamente significativas entre o desempenho dos dois produtos pelo que concerne a PEB.

Tabela 5 - Análise estatística da PEB do fator Dose dentro do fator Produto.

Fonte de variação	GL¹	SQ²	QM³	F⁴	p⁵
Microsource	1	2379,161446	2379,161446	6,05	0,0336* ⁶
Mistura	1	49,565296	49,565296	0,13	0,7298

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 5% de significância.

A análise estatística do fator Dose dentro do fator Produto apontou a presença de diferenças significativas entre as 2 doses do Microsource[®] “S” (Tabela 5). Pode-se então concluir que os 2 níveis do fator Dose dentro do nível 1 do fator Produto proporcionaram um desempenho diferente pelo que concerne a PEB, ou seja, a dose padrão (500g/t) e o dobro dela do Microsource[®] “S” tiveram um desempenho estatisticamente diferente, sendo que o dobro da dose padrão proporcionou uma PEB inferior a da dose padrão.

Tal resultado pode ter sido causado pela excessiva ação de liberação de nutrientes que o dobro da dose padrão de Microsource[®] “S” desenvolveu sobre o substrato. Isso pode ter levado a um parcial acúmulo de produtos intermediários (ácidos orgânicos) ao longo da cadeia trófica anaeróbia. Uma excessiva produção de ácidos pode inibir a ação das bactérias metanogênicas devido a particular sensibilidade dessas a ambientes com baixo pH (VERMA, 2002; ALKAYA; DEMIRER, 2010).

A mesma análise estatística efetuada sobre a PEB foi feita sobre a PMM (Tabela 6) e não apontando, em nenhuma fase da análise, diferenças estatisticamente significativas, pode-se então concluir que o desempenho dos tratamentos não apresenta diferenças do ponto de vista da qualidade do biogás produzido.

A luz do resultado da análise estatística até aqui conduzida, conclui-se então que nenhum dos produtos, nas doses testadas, proporciona incremento na produção

específica (Figura 14) ou na qualidade (conteúdo de CH₄) do biogás produzido a partir de dejetos de bovinos de corte.

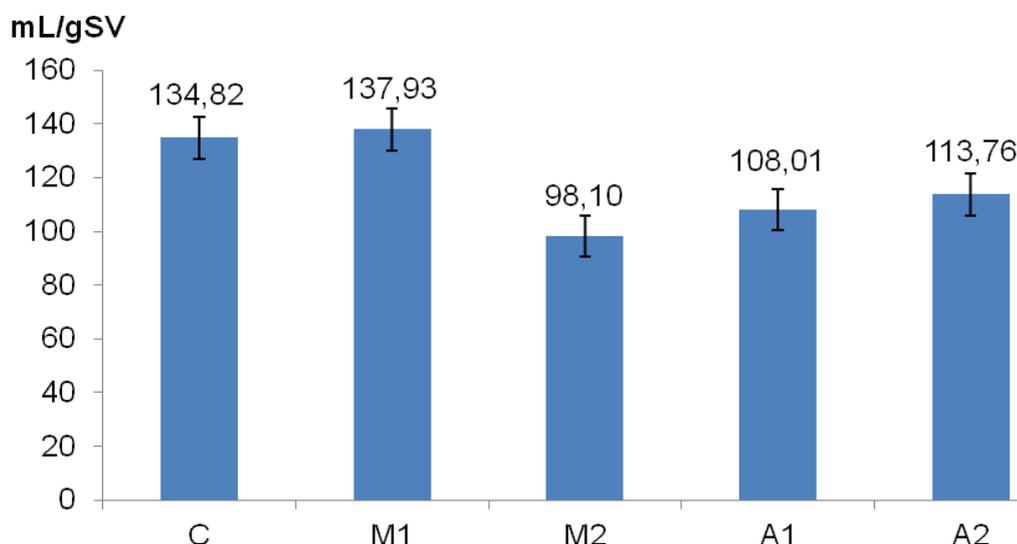


Figura 14 - Produção específica média de biogás do dejetos bovinos. C: controle; M1: Microsource[®] "S" 500g/t; M2: Microsource[®] "S" 1000g/t; A1: mistura 10ppm; A2: mistura 20ppm.

Tabela 6 - Teor porcentual médio de metano no biogás dos digestores batelada abastecidos com dejetos bovinos.

C	M1	M2	A1	A2
76,61	77,13	79,28	78,52	78,20

C: controle; M1: Microsource[®] "S" 500g/t; M2: Microsource[®] "S" 1000g/t; A1: mistura 10ppm; A2: mistura 20ppm.

5.2 Dejetos suíno – Fase 1

Os digestores batelada abastecidos com dejetos suíno também tiveram um desempenho conforme o esperado, alcançando, em cerca de 10 dias, e mantendo um teor porcentual de metano acima do 50%. Entretanto, o pico de produção volumétrica de biogás foi alcançado mais rapidamente que pelos digestores batelada abastecidos com dejetos bovinos, devido a diferente natureza do substrato e a mais elevada temperatura ambiental média (27°C) (Figura 15). A produção específica total de biogás também foi considerada satisfatória, sendo comparável com aquela encontrada por Orrico (2007).

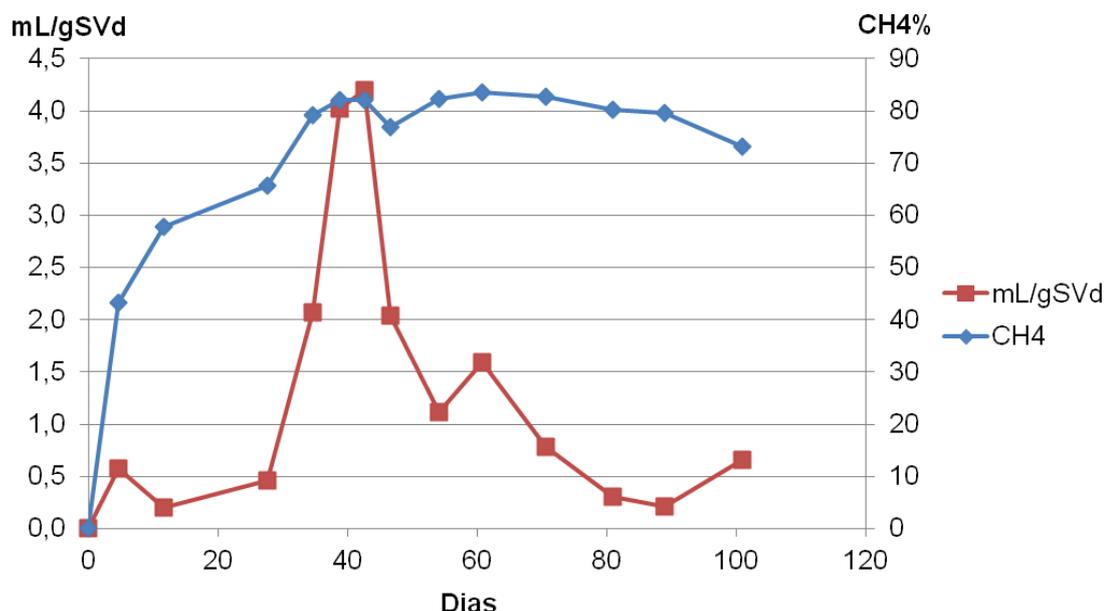


Figura 15 - Desempenho dos digestores batelada abastecidos com dejetos suínos.

A análise estatística dos resultados relativos ao dejetos suínos foi executada da mesma maneira ilustrada para o dejetos de bovinos. Para verificar as condições necessárias a uma correta análise da variância, foram examinadas a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e a presença de dados outlier. Não detectando incongruências, passou-se para a segunda fase, cujos resultados, são ilustrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise da variância da PEB (dejetos suínos).

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Controle	1	807,146649	807,146649	4,28	0,0654
Doses	1	1397,547026	1397,547026	7,41	0,0215* ⁶
Produtos	1	2,481775	2,481775	0,01	0,9109
Doses*Produtos	1	22,726616	22,726616	0,12	0,7357
Erro	10	1885,574228	188,557423		
Total	14	4115,476294			

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 5% de significância.

O resultado do teste F sobre os dados da PEB do dejetos suínos revelou que há pelo menos um nível do fator Dose que teve um desempenho estatisticamente diferente do controle com 5% de significância. A mesma análise, porém não apontou

presença de interação entre os dois fatores. Ao fim de determinar qual nível destacou-se, foi efetuado um confronto entre as médias de todo os tratamentos, cujos resultados são ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do confronto entre médias da PEB de todos os tratamentos.

Tratamentos	Microsource 500g/t	Mistura 10ppm	Microsource 1000g/t	Mistura 20ppm	Controle
Microsource 500g/t		0,8727	0,0551	0,0950	0,5677
Mistura 10ppm	0,8727		0,0726	0,1240	0,4675
Microsource 1000g/t	0,0551	0,0726		0,7507	0,0201* ¹
Mistura 20ppm	0,0950	0,1240	0,7507		0,0352* ¹
Controle	0,5677	0,4675	0,0201* ¹	0,0352* ¹	

¹significativo ao nível de 5% de significância.

O resultado do confronto entre as médias da PEB dos tratamentos indicou claramente que o nível 2 do fator Dose foi o que destacou-se, na comparação com o tratamento controle. Conclui-se então que tanto o dobro da dose padrão do Microsource® “S” quanto o dobro da dose padrão da mistura proporcionaram uma PEB significativamente inferior a do tratamento controle (Figura 16).

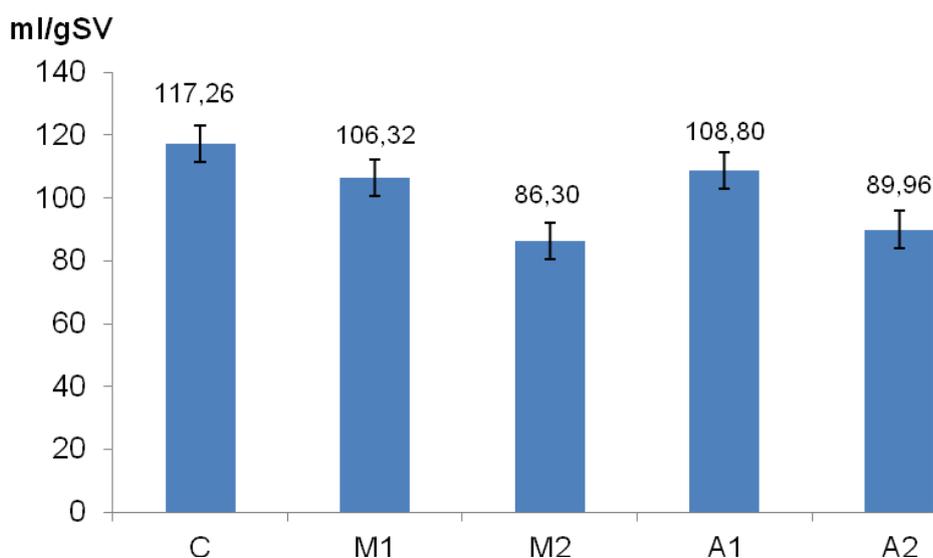


Figura 16 - Produção específica média de biogás do dejetos suíno. C: controle; M1: Microsource® “S” 500g/t; M2: Microsource® “S” 1000g/t; A1: mistura 10ppm; A2: mistura 20ppm.

Como ilustrado anteriormente no caso dos dejetos bovinos, o dobro da dose padrão dos dois produtos pode ter proporcionado uma excessiva liberação de nutrientes. Isso pode ter levado a uma parcial acidificação do meio que diminuiu a eficiência geral do processo de digestão (VERMA, 2002; ALKAYA; DEMIRER, 2010).

Por ser um experimento fatorial com fatores aninhados, continuou-se a análise estatística da PEB confrontando o efeito de cada nível do fator Dose dentro de cada nível do fator Produto (Tabela 9 e Tabela 10).

Tabela 9 - Análise estatística da PEB do fator Produto dentro do fator Dose.

Fonte de variação	GL¹	SQ²	QM³	F⁴	p⁵
Dose 1	1	5,0094046	5,0094046	0,03	0,8727
Dose 2	1	20,114345	20,114345	0,11	0,7505

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor

Tabela 10 - Análise estatística da PEB do fator Dose dentro do fator Produto.

Fonte de variação	GL¹	SQ²	QM³	F⁴	p⁵
Microsource	1	888,354428	888,354428	4,71	0,0551
Mistura	1	531,919215	531,919215	2,82	0,1240

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor

A análise do efeito de cada nível de um fator dentro do outro, não apontou diferenças estatisticamente significativas, ou seja, os tratamentos podem ser considerados iguais entre eles, pelo que concerne a produção específica de biogás.

A análise estatística dos dados relativos a porcentual média de metano (PMM; Tabela 11) não indicou diferenças estatisticamente significativas no confronto entre os tratamentos e o controle e também no confronto dos tratamentos entre eles.

Tabela 11 - Teor porcentual médio de metano no biogás dos digestores batelada abastecidos com dejetos suíno.

C	M1	M2	A1	A2
73,85	73,76	73,86	72,24	72,08

C: controle; M1: Microsource® "S" 500g/t; M2: Microsource® "S" 1000g/t; A1: mistura 10ppm; A2: mistura 20ppm.

Pode-se então concluir que nenhum dos produtos, nas doses testadas, proporciona incremento na produção total ou na qualidade (conteúdo de CH₄) do biogás produzido a partir de dejetos de suínos.

5.3 Resultados da Fase 1

Conforme planejado, a primeira fase do experimento tinha o objetivo de selecionar um tratamento (produto e dose) para depois ser testado nos digestores contínuos e, diante dos resultados da análise estatística, decidiu-se utilizar, na segunda fase do experimento, o único tratamento que proporcionou alguma (mesmo se pequena) melhoria ao processo. Assim foi escolhido o produto Microsource® “S” na dose padrão para ser testado com os dejetos bovinos.

Além disso, ao término da primeira fase do experimento com os dejetos bovinos, ainda não se dispunha dos dados sobre os dejetos de suínos (repetição dos ensaios) para se executar uma análise estatística e se tomar uma decisão sobre qual tratamento aplicar-se-ia à segunda fase. Por causa dos atrasos ocorridos na fase de construção e teste dos equipamentos também não houve a possibilidade de esperar o fim dos ensaios que estavam sendo repetidos. Decidiu-se, portanto, aplicar-se aos dejetos de suínos, na fase de operação contínua, o mesmo tratamento que seria aplicado aos dejetos de bovinos. Assim aplicou-se o Microsource® “S” na dose padrão também aos dejetos suínos.

A Tabela 12 mostra os volumes de biogás produzidos pelos digestores batelada respectivamente por kg de substrato e por kg de ST.

Tabela 12 - Volume em L de biogás produzido por kg de substrato (em cima) e por kg de ST (em baixo).

BC	BM1	BM2	BA1	BA2	SC	SM1	SM2	SA1	SA2
15,91	16,28	11,58	12,75	13,42	26,09	23,66	19,20	24,21	20,02
122,68	125,61	89,27	96,39	103,51	94,96	86,10	69,89	88,10	72,85

BC Bovino controle; BM1 Bovino com Microsource® “S” 500g/t; BM2 Bovino com Microsource® “S” 1000g/t; BA1 Bovino com mistura 10ppm; BA2 Bovino com mistura 20ppm; SC Suíno controle; SM1 Suíno com Microsource® “S” 500g/t; SM2 Suíno com Microsource® “S” 1000g/t; SA1 Suíno com mistura 10ppm; SA2 Suíno com mistura 20ppm;

5.4 Fase 2 - PEB

Na segunda fase do experimento foram analisados, em primeiro lugar, os mesmos parâmetros avaliados para a primeira fase, ou seja, PEB e PMM e, em seguida, os dados relativos as análises de ST, SV, CZ, pH, alcalinidade e acidez feitas sobre o material em saída dos digestores. Nesta fase os dados foram analisados de maneira conjunta.

Para verificar as condições necessárias a uma correta análise da variância, foram examinadas a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e a presença de dados outlier. Não detectando incongruências, passou-se para a segunda fase, cujos resultados, são ilustrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise da variância da PEB (dejetos bovino e suíno).

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Produto	1	2,31030443	2,31030443	6,22	0,0373* ⁶
Dejeto	1	15,41952472	15,41952472	41,49	0,0002*** ⁷
Produto*Dejeto	1	1,56234793	1,56234793	4,20	0,0745
Erro	8	2,97343113	0,37167889		
Total	11	22,26560822			

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 5% de significância; ⁷significativo ao nível de 1‰ de significância.

De acordo com o resultado da análise da variância, há pelo menos um tratamento cujo desempenho médio de PEB destacou-se no confronto com o controle, tanto dentro do fator Produto quanto dentro do fator Dejeto. A análise, porém, não apontou presença de interação entre os dois fatores. Para entender quais foram os tratamentos que se destacaram, continuou-se a análise estatística dos efeitos de cada nível de um fator dentro de cada nível do outro (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise estatística da PEB do fator Dejeto dentro do fator Produto.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Controle	1	3,582712	3,582712	9,64	0,0146* ⁶
Produto	1	13,399160	13,399160	36,05	0,0003*** ⁷

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 5% de significância; ⁷significativo ao nível de 1‰ de significância.

A análise estatística da PEB do fator Dejeito dentro do fator Produto indica que, tanto no confronto entre os dois tratamentos controle quanto entre os dois tratamentos que receberam o Microsource[®] “S”, há diferenças estatisticamente significativas aos níveis, respectivamente, de 5% e 1% de significância.

Conclui-se então que os dois tratamentos (Controle e Produto) com os dejetos bovinos tiveram uma produção específica de biogás significativamente maior dos respectivos tratamentos com dejetos suínos (Figura 17).

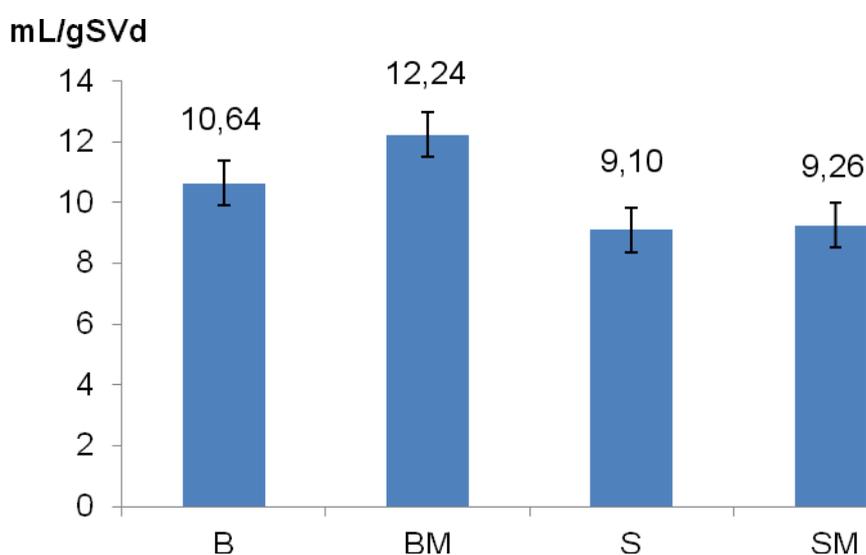


Figura 17 - Produção específica média diária de biogás dos dejetos bovino e suíno. B: bovino controle; BM: bovino com Microsource[®] “S”; S: Suíno controle; SM: suíno com Microsource[®] “S”.

Esse resultado, porém, pode ser diretamente atribuído ao baixo desempenho que os digestores contínuos abastecidos com dejetos suínos tiveram durante o primeiro mês de atividade (evidenciado pelo confronto entre os gráficos de produção: Figura 18 e Figura 19) conforme tratado anteriormente. Isso proporcionou uma produção inferior de biogás que, mesmo depois de reestabelecidas as normais condições de funcionamento, não foi possível recuperar.

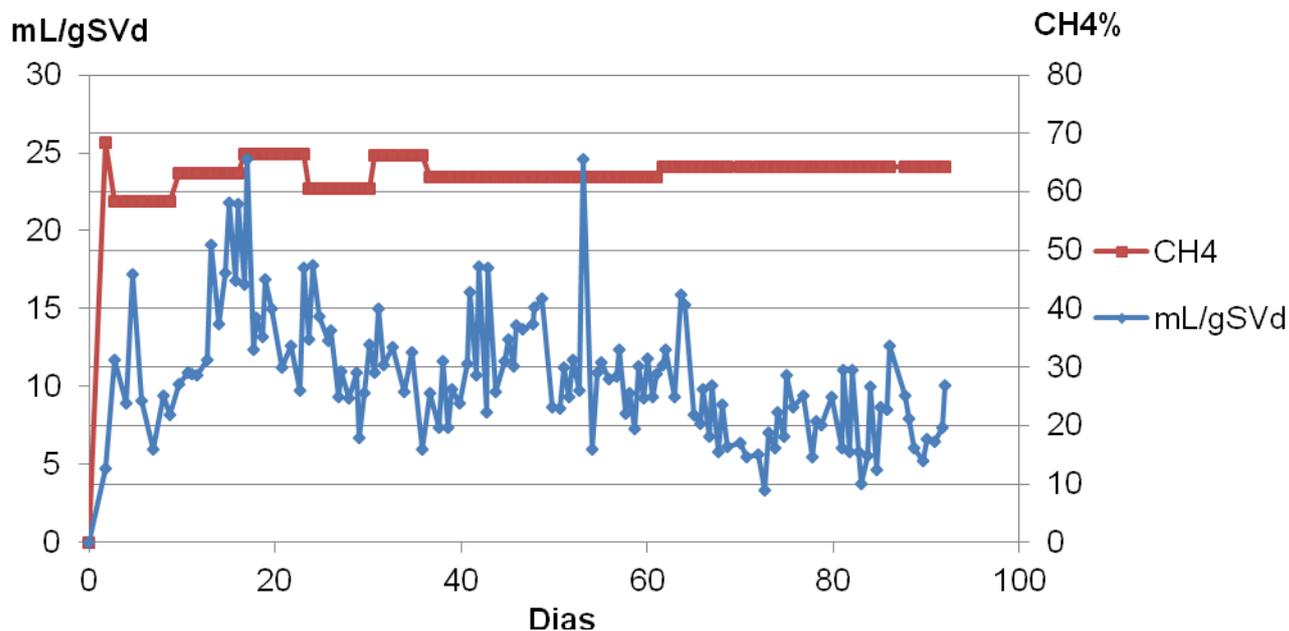


Figura 18 - Desempenho dos digestores contínuos abastecidos com dejetos bovinos.

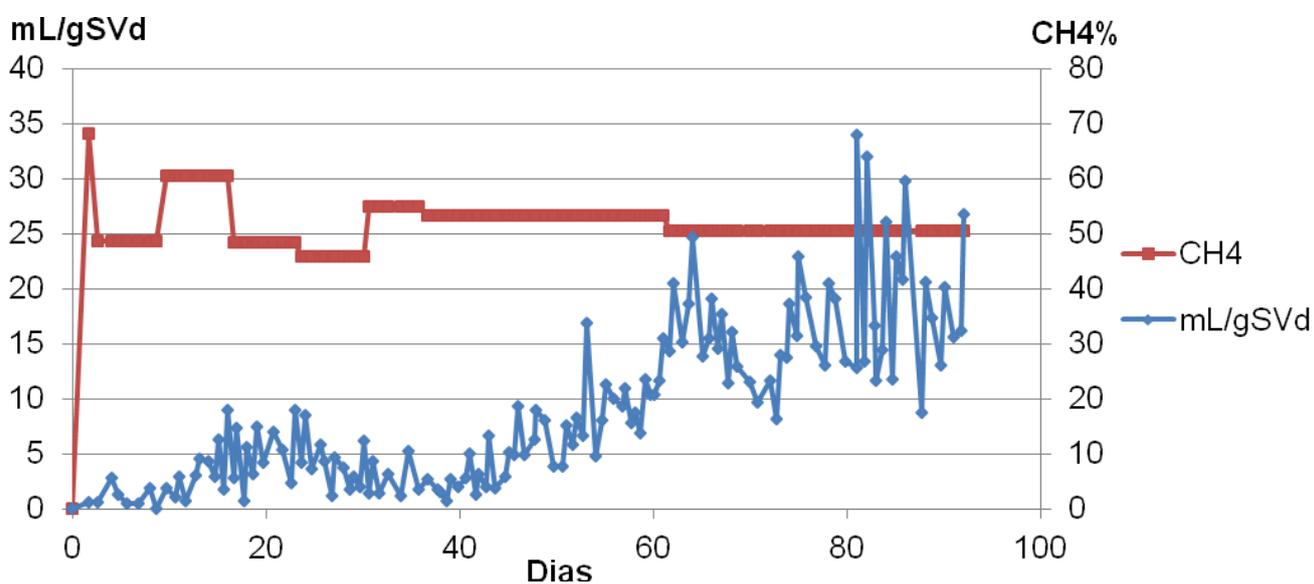


Figura 19 - Desempenho dos digestores contínuos abastecidos com dejetos suínos.

Dando continuidade a análise estatística, os resultados da análise do fator Produto dentro do fator Dejetos são ilustrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Análise estatística da PEB do fator Produto dentro do fator Dejeito.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Dejeito bovino	1	3,836194	3,836194	10,32	0,0124* ⁶
Dejeito suíno	1	0,036458	0,036458	0,10	0,7621

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 5% de significância.

Análise estatística da PEB do fator Produto dentro do fator Dejeito mostra como, dentro do dejeito bovino, houve pelo menos um nível do fator Produto cujo desempenho se destaca. Pode-se então concluir que os digestores abastecidos com dejetos bovinos que receberam o Microsource® “S” restituíram uma produção específica de biogás significativamente maior do que os respectivos digestores controles.

A adição de Microsource® “S” na dose de 500g/t proporcionou um aumento na produção específica de biogás de 15,03%.

Ao fim de superar as interferências nos resultados causadas pelos baixo desempenho dos digestores abastecidos com dejeito suíno na primeira parte do experimento, foram analisados os dados da PEB relativos aos últimos 30 dias, período em que esses últimos tiveram um desempenho estável e satisfatório.

A análise estatística apontou novamente uma diferença significativa entre os dois dejetos, sendo que desta vez foi o de suíno que destacou-se por ter tido uma produção específica de biogás superior. Também houve diferença, desta vez mais marcada, entre os digestores abastecidos com dejeito bovino que receberam o Microsource® “S” e o respectivo controle (Figura 20 e Tabela 16).

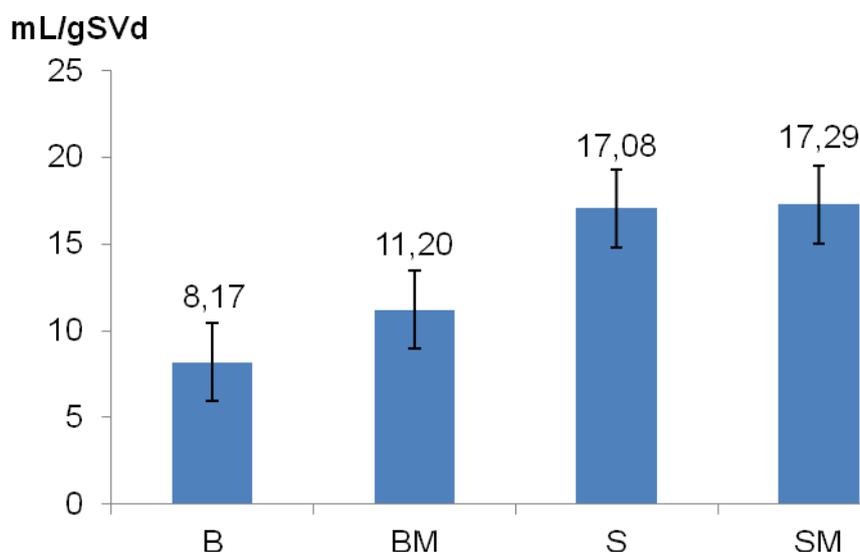


Figura 20 - Produção específica média diária de biogás dos dejetos bovino e suíno entre 60 e 90 dias. B: bovino controle; BM: bovino com Microsource® "S"; S: Suíno controle; SM: suíno com Microsource® "S".

Tabela 16 - Produção de biogás (em L) por kg de substrato adicionado (em cima) e por kg de ST adicionado (em baixo), relativa aos últimos 30 dias.

BC	BM	SC	SM
16,76	22,63	42,28	42,96
61,59	83,17	130,01	132,10

BC Bovino controle; BM Bovino com Microsource® "S" 500g/t; SC Suíno controle; SM Suíno com Microsource® "S" 500g/t.

5.5 Fase 2 – PMM

Conforme foi feito na primeira fase, nesta fase também analisou-se o percentual média de metano ao fim de determinar se os tratamentos aplicados tiveram alguma influência na qualidade do biogás produzido.

O resultado da análise da variância da PMM é ilustrado na Tabela 17.

Tabela 17 - Análise da variância da PMM (dejetos bovino e suíno).

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Produto	1	18,1544421	18,1544421	17,62	0,0030** ⁶
Dejeto	1	393,4294049	393,4294049	381,74	<0,0001*** ⁷
Produto*Dejeto	1	0,2889699	0,2889699	0,28	0,6108
Erro	8	8,2449084	1,0306135		
Total	11	420,1177254			

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 1% de significância; ⁷significativo ao nível de 1‰ de significância.

O resultado da análise dos dados relativos a PMM indicou que dentro do fator Dejeto e também dentro do fator Produto há pelo menos um nível de tratamento que difere em maneira significativa do respectivo tratamento controle. Para entender quais foram os tratamentos que se destacaram, foi executada a análise estatística dos efeitos de cada nível de um fator dentro de cada nível do outro (Tabela 18).

Tabela 18 - Análise estatística da PMM do fator Dejeto dentro do fator Produto.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Controle	1	186,196670	186,196670	180,67	<0,0001*** ⁶
Produto	1	207,521705	207,521705	201,36	<0,0001*** ⁶

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 1‰ de significância.

A análise estatística do fator Dejeto dentro do fator Produto apontou que, tanto entre os dois tratamentos controle quanto entre os tratamentos com produto, houve uma diferença estatisticamente muito significativa pelo que concerne a PMM. Pode-se então concluir que o nível bovino do fator Dejeto destacou-se por ter proporcionado uma PMM superior a do nível suíno, ou seja, o biogás produzido pelos digestores abastecidos com dejeto bovino teve um conteúdo percentual de metano significativamente maior que o biogás produzido pelos digestores abastecidos com dejetos suínos (Tabela 19).

Tabela 19 - Teor percentual médio de metano no biogás dos digestores contínuos.

B	BM	S	SM
63,36	60,88	51,89	49,12

B: bovino controle; BM: bovino com Microsource® “S”; S: Suíno controle; SM: suíno com Microsource® “S”.

Tal resultado, porém, não deixa de ser influenciado pelo baixo desempenho que os digestores contínuos abastecidos com dejetos suínos tiveram durante o primeiro mês de atividade. De fato a acidificação do meio influenciou a quantidade de biogás produzido bem como a qualidade do mesmo, resultando, em alguns períodos, em um conteúdo percentual de metano inferior a 50%.

Dando continuidade a análise estatística, os resultados da análise do fator Produto dentro do fator Dejeito são ilustrados na Tabela 20.

Tabela 20 - Análise estatística da PMM do fator Produto dentro do fator Dejeito.

Fonte de variação	GL¹	SQ²	QM³	F⁴	p⁵
Dejeito bovino	1	6,931272	6,931272	6,73	0,0319* ⁶
Dejeito suíno	1	11,512140	11,512140	11,17	0,0102* ⁶

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 5% de significância.

A análise estatística do fator Produto dentro do fator Dejeito indicou que, tanto dentro do nível suíno do fator Dejeito quanto dentro do nível bovino, houve um nível do fator Produto que destacou-se pelo que concerne a PMM. Conclui-se, então, que os digestores que receberam o Microsource® “S” destacaram-se por ter proporcionado uma produção de biogás com um conteúdo percentual de metano inferior a dos respectivos tratamentos controle.

De acordo com os resultados da análise estatística da PMM, pode-se afirmar que a aplicação do produto Microsource® “S” na dose de 500g/t diminui o conteúdo percentual de metano no biogás. Tal diminuição foi calculada ser de 2,15% para o dejeito bovino e de 2,77% para o suíno.

Esse resultado deve-se ao fato que os dois produtos desenvolvem uma ação de liberação de nutrientes na fase de hidrólise, então os microrganismos que beneficiam desta ação são, em primeiro lugar, os que são ativos nas fases de

acidogênese e acetogênese. Essas fases são responsáveis por grande parte do volume de CO₂ produzido no processo de digestão anaeróbia (TOPRAK, 1995; PONSÁ, et al., 2008), por isso a aplicação dos dois produtos gerou diminuição no teor de metano.

5.6 pH, Alcalinidade e Acidez

Ao longo da segunda fase do experimento foram executadas análises sobre o material em saída dos digestores relativas a pH, alcalinidade e acidez, além de análises do conteúdo de ST, SV e CZ. Os três primeiros parâmetros são tratados de forma conjunta, pois podem ser considerados todos indicadores do “bom estado de saúde” do processo anaeróbio: a alcalinidade indica a capacidade do meio de neutralizar um eventual excesso de ácidos orgânicos e contrastar mudanças de pH que podem ser prejudiciais a atividade bacteriana (MOCKAITIS, et al., 2006); a acidez é uma medida da quantidade de ácidos orgânicos presentes no meio e o pH é um dos parâmetros fundamentais para que o processo anaeróbio aconteça da forma desejada.

A análise estatística dos dados relativos a pH, alcalinidade e acidez seguiu o mesmo roteiro que a análise da PEB e PMM. Não tendo detectado, na análise preliminar, dados outlier ou anormalidade na distribuição do resíduo do erro estudentizado, continuou-se com a análise da variância dos dados relativos ao pH, cujos resultados estão ilustrado na Tabela 21.

Tabela 21 - Análise da variância do pH (dejetos bovino e suíno).

Fonte de variação	GL¹	SQ²	QM³	F⁴	p⁵
Produto	1	0,00040833	0,00040833	0,10	0,7636
Dejeto	1	2,64945731	2,64945731	628,13	<0,0001*** ⁶
Produto*Dejeto	1	0,00037568	0,00037568	0,09	0,7730
Erro	8	0,03374422	0,00421803		
Total	11	420,1177254			

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 1% de significância.

O resultado da análise da variância do pH indicou que houve pelo menos um nível do fator Dejeto que caracterizou-se por ter um pH médio estatisticamente

diferente do outro nível. Conforme os resultados, não houve interação significativa entre os dois fatores.

A sucessiva análise do efeito de cada nível de um fator dentro de cada nível do outro (Tabela 22 e Tabela 23) permitiu entender quais os tratamentos em que houve uma diferença significativa de pH.

Tabela 22 - Análise estatística do pH do fator Dejeito dentro do fator Produto.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Controle	1	1,356466	1,356466	321,59	<0,0001*** ⁶
Produto	1	1,293367	1,293367	306,63	<0,0001*** ⁶

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶significativo ao nível de 1% de significância.

Tabela 23 - Análise estatística do pH do fator Produto dentro do fator Dejeito.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Dejeito bovino	1	0,000784	0,000784	0,19	0,6778
Dejeito suíno	1	0,000000340	0,000000340	0,00	0,9931

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quadrado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor.

Conforme o que os resultados da análise estatística apontaram, os dois tratamentos controle bem como os tratamentos que receberam o Microsource® “S” diferem entre si, enquanto não houve diferenças significativas entre os dois níveis do fator Produto dentro dos dois níveis do fator Dejeito. Pode-se concluir, então, que os dois dejetos, como esperado, caracterizaram-se por terem pH médios estatisticamente diferentes, sendo que o pH dos digestores abastecidos com dejetos suínos (pH 6,25) foi inferior ao dos digestores abastecidos com dejetos bovinos (pH 7,19).

Dando continuidade a análise estatística, foram analisados os dados relativos a alcalinidade média. Na análise preliminar foi encontrado um dado outlier (relativo a primeira repetição do tratamento controle do dejeito bovino) que foi substituído com o valor médio do tratamento. Os resultados da análise estão ilustrados na Tabela 24.

Tabela 24 - Análise da variância da alcalinidade (dejetos bovino e suíno).

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Produto	1	179376,728	179376,728	6,59	0,0333* ⁶
Dejeto	1	3469942,500	3469942,500	127,45	<0,0001*** ⁸
Produto*Dejeto	1	655332,861	655332,861	24,07	0,0012** ⁷
Erro	8	4522466,935	27226,856		
Total	11	420,1177254			

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶Significativo ao nível de 5% de significância; ⁷Significativo ao nível de 1% de significância; ⁸significativo ao nível de 1% de significância.

Conforme os resultados da análise estatística houve pelo menos um dos digestores tratados com Microsource® “S” cuja alcalinidade média foi significativamente diferente do respectivo nível controle. A análise ainda indicou uma diferença significativa entre os dois níveis do fator Dejeto e também a interação entre os dois fatores revelou-se estatisticamente significativa. Por isso, continuou-se com a análise do efeito de cada nível de um fator dentro de cada nível do outro fator, cujos resultados estão ilustrados nas Tabela 25 e Tabela 26.

Tabela 25 - Análise estatística da Alcalinidade do fator Dejeto dentro do fator Produto.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Controle	1	3570606	3570606	131,14	<0,0001*** ⁷
Produto	1	554670	554670	20,37	0,0020** ⁶

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶Significativo ao nível de 1% de significância; ⁷Significativo ao nível de 1% de significância;

Tabela 26 - Análise estatística da Alcalinidade do fator Produto dentro do fator Dejeto.

Fonte de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F ⁴	p ⁵
Dejeto bovino	1	74497	74497	2,74	0,1367
Dejeto suíno	1	760213	760213	27,92	0,0007** ⁶

¹Graus de liberdade; ²Soma de quadrados; ³Quarado médio; ⁴F calculado; ⁵p-valor; ⁶Significativo ao nível de 1% de significância.

Conforme os resultados da análise dos dados relativos a alcalinidade dos fatores aninhados, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os dois níveis do fator Dejeito e também entre os dois níveis do fator produto dentro do nível suíno do fator Dejeito. Pode-se concluir, então, que os dejetos bovino e suíno tiveram valores médios de alcalinidade significativamente diferentes. Também, os valores de alcalinidade média dos digestores abastecidos com dejeito suíno que receberam o Microsource[®] “S” revelaram-se estatisticamente diferentes dos respectivos digestores controle.

Concluindo: os dois dejetos utilizados no experimento caracterizaram-se por ter valores médios de alcalinidade estatisticamente diferentes, sendo que os digestores abastecidos com dejeito bovino tiveram valores de alcalinidade menores. A aplicação do Microsource[®] “S” na dose de 500g/t no dejeito suíno também influenciou significativamente a alcalinidade, deixando-a menor que no respectivo tratamento controle (Figura 21).

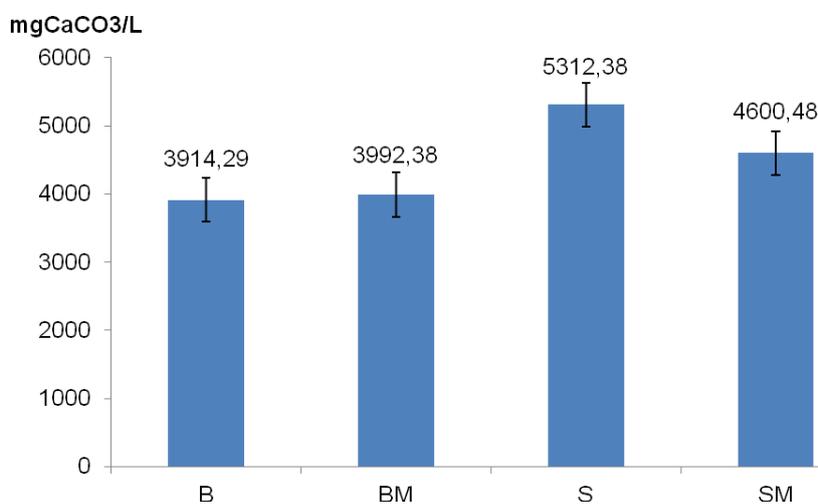


Figura 21 - Alcalinidade média com indicado o valor de cada tratamento. B: Bovino controle; BM: bovino com Microsource[®] “S”; S: Suíno controle; SM: suíno com Microsource[®] “S”.

Os resultados da análise estatística dos dados relativos a acidez levam, coerentemente com a análise dos dados da alcalinidade, às mesmas conclusões: os dejetos de bovinos de corte e de suínos caracterizaram-se por ter valores de acidez média significativamente diferentes e a aplicação do Microsource[®] “S” na dose de

500g/t no dejecto suíno também influenciou significativamente a acidez, deixando-a menor que no respectivo tratamento controle (Figura 22).

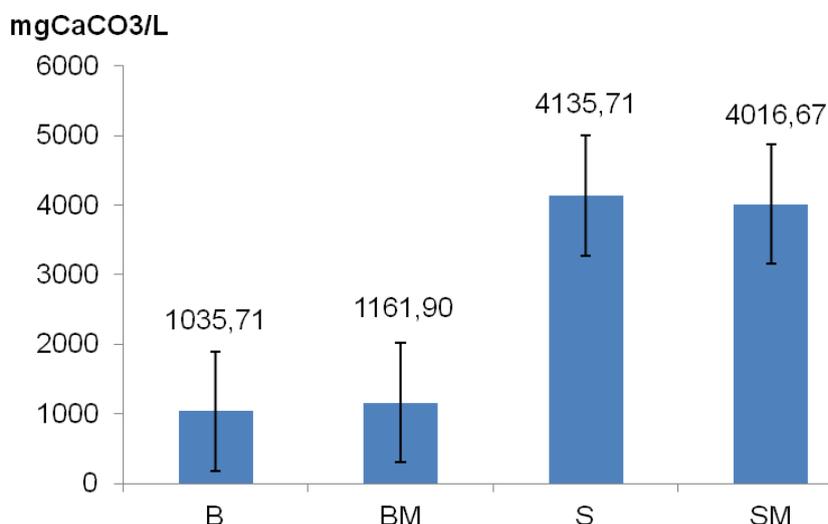


Figura 22 - Acidez média com indicado o valor de cada tratamento. B: Bovino controle; BM: bovino com Microsource® "S"; S: Suíno controle; SM: suíno com Microsource® "S".

5.7 ST, SV e CZ

A análise estatística dos dados relativos aos conteúdos de ST, SV e CZ do material em saída dos digestores não apontou nenhuma diferença estatisticamente significativa, a não ser entre os dois dejetos (Figura 23).

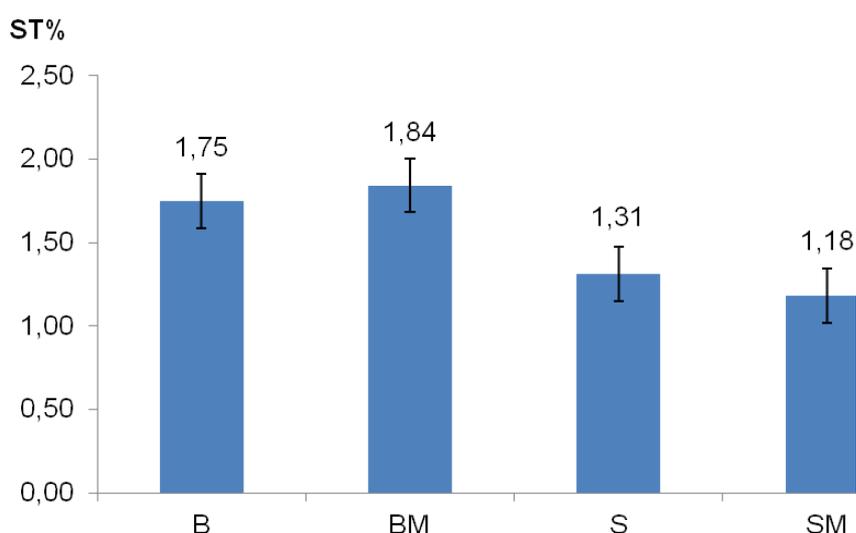


Figura 23 - Conteúdo percentual médio de ST do material em saída dos digestores, com indicado o valor médio de cada tratamento. B: Bovino controle; BM: bovino com Microsource® "S"; S: Suíno controle; SM: suíno com Microsource® "S".

Tal diferença é causada pela diferente natureza dos dois dejetos utilizados para abster os digestores. O dejetos de bovino de corte apresentou certo conteúdo de fibras que tem maior predisposição a ficar em suspensão em um meio líquido. O dejetos de suíno, ao contrário, caracterizou-se por ser constituído por partículas de menor dimensão e maior peso e com mais predisposição a se depositar no fundo dos digestores.

5.8 Resultados da Fase 2

A luz dos resultados da análise estatística de PEB, PMM, pH, alcalinidade, acidez e conteúdo de ST, SV, CZ dos digestores contínuos, conclui-se que a aplicação de Microsource® “S”, na dose sugerida pela empresa (500g/t), proporciona um aumento de 15,03% na produção específica de biogás, quando aplicado a digestão anaeróbia de dejetos de bovinos de corte, porém influencia de maneira negativa a qualidade do biogás produzido, diminuindo o conteúdo porcentual de metano de 2,15% e de 2,77% quando aplicado, respectivamente, a dejetos bovinos ou suínos.

A mesma quantidade de Microsource® “S” não proporcionou aumento na quantidade de biogás produzido a partir de dejetos suínos. O resultado relativo ao dejetos suíno, porém, foi influenciado pelos problemas que ocorreram durante o primeiro mês de atividade, resultando em uma produção de biogás inferior as expectativas, e em uma diferença, entre o tratamento controle e o tratamento com Microsource® “S”, estatisticamente não significativa.

A aplicação de Microsource® “S” também diminuiu de maneira estatisticamente significativa os valores de alcalinidade e acidez, respectivamente de 13,4% e de 2,88% quando utilizado na digestão anaeróbia de dejetos suínos.

A Tabela 27 mostra os volumes de biogás produzido pelos digestores contínuos respectivamente por kg de substrato adicionado e por kg de ST adicionado.

Tabela 27 - Produção de biogás (em L) por kg de substrato adicionado (em cima) e por kg de ST adicionado (em baixo).

BC	BM	SC	SM
69,56	78,20	61,83	63,56
255,64	287,38	190,12	195,46

BC Bovino controle; BM Bovino com Microsource[®] "S" 500g/t; SC Suíno controle; SM Suíno com Microsource[®] "S" 500g/t.

5 CONCLUSÕES

A adição do produto Microsource® “S”, na dose de 500g por tonelada de dejetos produziu os seguintes efeitos:

- Aumentou a produção específica de biogas mediamente em 15,03%, quando aplicado aos dejetos de bovinos de corte, proporcionando aumento no volume total de biogás produzido.
- Diminuiu o conteúdo porcentual de metano de 2,15% e de 2,77% quando aplicado, respectivamente, a dejetos de bovinos de corte e de suínos.
- Diminuiu os valores de alcalinidade e acidez, respectivamente de 13,4% e de 2,88% quando utilizado na digestão anaeróbia de dejetos suínos.

6 IMPLICAÇÕES

O estudo conduzido apontou maior eficácia do produto quando utilizado na digestão anaeróbia de dejetos bovinos. Porém, tal resultado, como já dito acima, foi provavelmente influenciado pelo baixo desempenho inicial dos digestores com dejetos suínos e, além do mais, o Microsource® “S” é um produto desenvolvido especificamente para tratamento de dejetos suínos. De fato, sendo constituído de microrganismos e enzimas com função proteolítica, deveria proporcionar um efeito maior sobre substratos com maior conteúdo de proteínas, como os dejetos suínos, do que de fibras, como os dejetos bovinos. Por essas razões, recomenda-se aprofundar o estudo do emprego do ativador biológico comercial Microsource® “S” em digestão anaeróbia de diferentes substratos.

REFERÊNCIAS

ALKAYA, E., DEMIRER G., N. Anaerobic acidification of sugar-beet processing wastes: Effect of operational parameters, **Biomass and Bioenergy**, 2010.

ANGELIDAKI, I., AHRING B., K. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. **Water Sci Technol.** 2000;41(3), pp.189-94.

ANGONESE, A. R; CAMPOS, T., A.; ZACARKIM, C. E; MATSUO, S., M.; CUNHA, F. Eficiência energética de sistema de produção de suínos com tratamento dos resíduos em biodigestor. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** 2006, vol.10, n.3, pp. 745-750 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-3662006000300030&lng=pt&nrm=iso>.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** American Public, Health Association, Washington, DC, USA. 2005.

APPELS, L., BAEYENS, J., DEGRÈVE J., DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science** 34 (2008), pages 755–781.

BOCHMANN, G.; HERFELLNER, T.; SUSANTO, F.; KREUTER, F.; PESTA, G. Application of enzymes in anaerobic digestion. **Water Science & Technology** Vol 56 No 10 (2007) pp 29–35.

BRASIL. Ministério das Minas e Energia. **Balanco energético nacional.** 2012. <<https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioFinal2012.aspx>>.

BRUMMELER, E., KOSTER, I.W. Enhancement of dry anaerobic batch digestion of the organic fraction of municipal solid waste by an aerobic pretreatment step. **Biological Wastes**, Volume 31, Issue 3, 1990, Pages 199-210.

CECCHI, F., BATTISTONI, P.; PAVAN, P.; BOLZONELLA, D.; INNOCENTI, L. **Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi.** APAT, Manuali e linee guida 13/2005.

CIRNE, D.G., LEHTOMA, A., BJÖRNSSON, L., BLACKALL, L., L. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. **Journal of Applied Microbiology**. Volume 103, Issue 3, pages 516–527, September 2007.

DAVIDSSON, A., WAWRZYNCZYK, J., NORRLOW, O., LA COUR JANSEN, J., 2007. Strategies for enzyme dosing to enhance anaerobic digestion of sewage sludge. **J. Residuals Sci. Technol.** 4 (1), pp. 1–7.

DE BAERE, L., VAN MEENEN, P.; DEBOOSERE, S.; VERSTRAETE, W. Anaerobic fermentation of refuse. **Resources and Conservation**, Volume 14, 1987, Pages 295-308.

DSM. **MicroSource® S. A Proactive Management Tool**. DSM 2005. http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnpna/MS_Brochure.pdf. Acesso em 25/02/2013.

DUNCAN, M. HORAN, N., J. **Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Academic Press, 2003.

EASTMAN, J., A. FERGUSON, J., F. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. **J. Wat. Poll. Control Fed.** Vol. 53, No. 3, Part I (Mar., 1981), pp. 352-366.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations 2010. Dados disponíveis em <http://faostat3.fao.org>

GALBIATTI, J. A., CAMELO A., D., SILVA, G., F.; GERARDI, E., A., B., CHICONATOI, A., D. Estudo qualitativo do biogás produzido por substratos em biodigestores tipo batelada. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** 2010, vol.14, n.4, pp. 432-437. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662010000400013&lng=pt&nrm=iso.

GORDON, R. E.; HYDE, J. L.; MOORE, J. A. *Bacillus firmus-Bacillus lentus*: a Series or One Species? **International Journal Of Systematic. Bacteriology**, July 1977, pp. 256-262.

GUJER, W.; ZHENDER, A.J.B. Conversion processes in anaerobic digestion. **Water Science and Technol.** 15 (1983), pp. 127-167.

JUANGA, J. P. **Optimizing dry anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste.** Dissertação de mestrado. Asian Institute of Technology, 2005.

LI, J.; BAN, Q.; ZHANG, L.; KUMAR JHA, A. Syntrophic propionate degradation in anaerobic digestion: a review. **Int. J. Agric. Biol.**, 14, pp. 843–850, 2012.

LYBERATOS, G.; SKIADAS, I., V. Modelling of anaerobic digestion – A review. **Global Nest: the Int. J.** Vol 1, No 2, pp 63-76, 1999.

MARCHAIM, U. **Biogas process for sustainable development.** FAO 1992. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/T0541E/T0541E00.HTM>>. Acesso em 24/02/2013.

MATA-ALVAREZ, J. **Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes.** IWA Publishing, 2003.

MCCARTY, P.L., SMITH, D.P. Anaerobic wastewater treatment. **Environmental science and technology**, 20, pages 1200-1206, 1986.

MENESES, S., L. **Cana de açúcar e silagem de cana com estérco bovino na produção de biogás.** Tese de doutorado, UNESP Jaboticabal, 2011.

MOON H.,C.; SONG, I.,S. Enzymatic Hydrolysis of FoodWaste and Methane Production Using UASB Bioreactor. **International Journal of Green Energy** Volume: 8 Issue: 3 Pages: 361-371, 2011.

MOCKAITIS, G., SUZANA M. RATUSZNEI, JOSÉ A.D. RODRIGUES, ZAIAT, M., FORESTI, E. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity, **Journal of Environmental Management**, Volume 79, Issue 2, April 2006, Pages 198-206,

NOIKE, T.; ENDO, G.; CHANG, J., E.; YAGUCHI, J.; MATSUMOTO, J. Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. **Biotechnol Bioeng.** 1985 Oct;27(10), pages 482-9.

NOVAK, J., T.; SADLER, M., E.; MURTHY, S., N. Mechanisms of floc destruction during anaerobic and aerobic digestion and the effect on conditioning and dewatering of biosolids. **Water Research**, Volume 37, Issue 13, July 2003, Pages 3136-3144.

ORRICO J. M. A. P.; ORRICO, A. C. A. e LUCAS, J. J. de. Produção animal e o meio ambiente: uma comparação entre potencial de emissão de metano dos dejetos e a quantidade de alimento produzido. **Eng. Agríc.** 2011, vol.31, n.2, pp. 399-410. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162011000200020&lng=pt&nrm=iso>.

ORRICO J. M. A. P. **Biodigestão anaeróbia e compostagem de dejetos de suínos, com e sem separação de sólidos.** Dissertação de mestrado. UNESP Jaboticabal, 2007.

OSTREM, K. **Greening Waste: Anaerobic Digestion For Treating The Organic Fraction Of Municipal Solid Wastes.** Dissertação de mestrado. Earth Engineering Center Columbia University, 2004.

PIMENTEL, A. E. B.; BUENO, O. de C.; SIMON, E. J.; ESPERANCINI, M. S. T. **Soberania energética na agricultura familiar – o caso do assentamento área III – Fazenda Pirituba II – Itaberá (SP);** 2009. Disponível em: <http://www.ambiente-augm.ufscar.br/uploads/A3-077.pdf>.

PONSÁ, S., FERRER, I., VÁZQUEZ, F., FONT, X. Optimization of the hydrolytic–acidogenic anaerobic digestion stage of sewage sludge: Influence of pH and solid content. **Water Research**, Volume 42, Issue 14, August 2008, Pages 3972-3980.

ROMAN, H.J.; BURGESS, J.E. E PLETSCHKE, B.I. Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. **African Journal of Biotechnology** Vol. 5 (10), pp. 963-967, 16 May 2006.

SANTI, L. **Valutazione della potenzialità produttiva in termini di biogas di alcune biomasse di origine agro-zootecnica.** Tesi di laurea. Università di Torino. 2008.

TAKEMOTO, S., Y. **Pré-tratamentos de lodos biológicos gerados nos processos de lodos ativados para o aumento da sua biodegradabilidade através de hidrólise enzimática, térmica e alcalina.** Tese de doutorado UFSC, Florianópolis-SC, 2006.

TOPRAK, H. Temperature and organic loading dependency of methane and carbon dioxide emission rate of a full scale waste stabilization pond. **Wat. Res.** Vol. 29, No. 4, pp. 1111-1119, 1995.

VALLADÃO, A., B., G.; FREIRE, D., M., G.; CAMMAROTA, M., C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Volume 60, Issue 4, 2007, Pages 219-225.

VDI 4630. **Fermentation of organic materials, characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests.** 2006. Beuth-Verlag, Berlin.

VEEKEN, A.; KALYUZHNYI, S.; SCHARFF, H.; HAMELERS, B. Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. **Journal of Environmental engineering**, Pages 1078-1081, 2000.

VERMA, S. **Anaerobic digestion of degradable organics in municipal solid wastes.** Dissertação de mestrado. Columbia University. Maio de 2002.

YANG, Q.; LUO, K.; LI X., M.; WANG, D.; ZHENG, W.; ZENG, G.; LIU, J. Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. **Bioresource Technology** 101 (2010) pages 2924–2930.