



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS



Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS DE  
INSETICIDAS EM PROCESSOS ANAERÓBIOS DE GERAÇÃO  
DE BIOGÁS

Ana Paula Bortolucci

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Imaculada Maintinguer

Rio Claro (SP)  
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Câmpus de Rio Claro

ANA PAULA BORTOLUCCI

REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS DE  
INSETICIDAS EM PROCESSOS ANAERÓBIOS DE  
GERAÇÃO DE BIOGÁS

Trabalho de Formatura apresentado ao  
Instituto de Geociências e Ciências Exatas -  
Câmpus de Rio Claro, da Universidade  
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para  
obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro - SP

2016

628.092 Bortolucci, Ana Paula  
B739r Reaproveitamento de resíduos industriais de inseticidas  
em processos anaeróbios de geração de biogás / Ana Paula  
Bortolucci. - Rio Claro, 2016  
56 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Engenharia ambiental) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e  
Ciências Exatas

Orientadora: Sandra Imaculada Maintinguer

1. Engenharia ambiental. 2. Digestão anaeróbia. 3.  
Resíduo industrial. 4. Gás metano. 5. Reator batelada. I.  
Título.

ANA PAULA BORTOLUCCI

REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS DE  
INSETICIDAS EM PROCESSOS ANAERÓBIOS DE  
GERAÇÃO DE BIOGÁS

Trabalho de Formatura apresentado ao  
Instituto de Geociências e Ciências Exatas -  
Câmpus de Rio Claro, da Universidade  
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para  
obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Imaculada Maintinguer (orientadora)  
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / UNESP / Rio Claro

Prof. Dr. Marcus Cesar Avezum Alves de Castro  
Instituto de Geociências e Ciências Exatas / UNESP / Rio Claro

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lorena Oliveira Pires  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

Rio Claro, 23 de novembro de 2016.

Ana Paula Bortolucci

Sandra Imaculada Maintinguer

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão, pela compreensão, paciência, e amor, e por todos os sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao Luiz Paulo, pelo carinho e apoio incondicional.

À Prof<sup>a</sup>. Sandra pela orientação, correção e dedicação a este trabalho, e também ao Prof. Marcus e à Prof<sup>a</sup> Lorena pela leitura e contribuição na avaliação e melhoramento da minha formação.

À equipe de funcionários do Instituto de Pesquisa em Bioenergia pelo suporte oferecido, e pela prontidão em ajudar.

Ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da USP – EESC – São Carlos – SP pelas análises químicas realizadas.

Ao Vladimir, do Laboratório de Preparação de Amostras para DRX e FRX, do IGCE, pela disponibilidade em ajudar e pelas análises químicas realizadas.

Às amigas que sempre estiveram ao meu lado, por todo o incentivo e os momentos de alegria.

A todos os amigos e familiares que, direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

À UNESP pela oportunidade de ampliação dos meus conhecimentos.

E, finalmente, agradeço a Deus por tudo.

*“Na natureza nada se perde, nada se cria, tudo se transforma”*  
(Lavoisier)

## RESUMO

O biogás pode ser considerado um potencial biocombustível, pois é constituído principalmente por gás metano, dióxido de carbono e hidrogênio. É produto da digestão anaeróbia, onde resíduos industriais podem servir como substrato, por terem matéria orgânica prontamente assimilável. Dentre estes, os resíduos industriais de inseticidas, contém constituintes tóxicos químicos, como Hidrametilnona, Imidaclopride, Indoxacarbe, dentre outros. Deste modo, este trabalho visou avaliar o potencial da geração de biogás em reatores anaeróbios em batelada a partir de resíduos de indústrias de inseticidas. Foram realizadas três etapas: Teste preliminar com as fontes de inóculo provenientes de lodos mesofílicos de reatores UASB; Caracterização do resíduo industrial e Operação dos reatores anaeróbios em batelada para obtenção do biogás, onde foram usados reatores com 20% de inóculo, meio PYG modificado, pH 7,0, 37°C e *headspace* com N<sub>2</sub> (100%). Todos os inóculos testados produziram biogás e gás metano, os melhores inóculos foram os de aviculturas. Para os cultivos com meio PYG e acetato de sódio, as melhores concentrações foram para 2 g de fonte de carbono.l<sup>-1</sup>. O resíduo industrial apresentou pH ácido, elevadas concentrações de matéria orgânica, cerca de 75g DQO.l<sup>-1</sup>, e predomínio de bacilos acidófilos. Em todos os reatores anaeróbios houve a conversão da matéria orgânica em biogás, produzindo gás metano em elevadas concentrações e apresentando bacilos acidófilos e bactérias filamentosas. Na condição com 100% de meio de cultivo foram consumidos 81% de DQO e obteve-se 77% de gás metano no *headspace*.

*Palavras chave: digestão anaeróbia; resíduo industrial; biogás; gás metano.*

## ABSTRACT

Biogas can be considered a potential biofuel, as it is mainly composed of methane gas, carbon dioxide and hydrogen. It is the product of anaerobic digestion, where industrial waste can serve as a substrate, because they have readily assimilable organic matter. Among these, the industrial residues of insecticides, contain toxic chemical constituents such as Hidrametilnona, Imidaclopride, Indoxacarbe, among others. Thus, this work aimed to evaluate the biogas generation potential in batch anaerobic reactors from residues from insecticide industries. Three phases were performed: Preliminary test with inoculum sources from mesophilic sludge from UASB reactors; Characterization of industrial waste and Operation of anaerobic reactors in batch to obtain biogas, where reactors with 20% of inoculum, modified PYG medium, pH 7.0, 37°C and *headspace* with N<sub>2</sub> (100%). All the inoculums tested produced biogas and methane gas, the best inocula were those of aviculture. For cultures with PYG and sodium acetate medium, the best concentrations were for 2 g of carbon source.l<sup>-1</sup>. The industrial residue had acid pH, high concentrations of organic matter, about 75 g COD.l<sup>-1</sup>, and a predominance of acidophilic bacilli. In all the anaerobic reactors, the organic matter was converted into biogas, producing methane gas at high concentrations and presenting acidophilic bacilli and filamentous bacteria. In the condition with 100% of culture medium, 81% of COD were consumed and 77% of methane gas was obtained in the *headspace*.

*Key words: anaerobic digestion; industrial waste; biogas; methane.*

## LISTA DE TABELAS

	p.
<b>Tabela 2.1</b> Composição típica do biogás oriundo da digestão anaeróbia de lodos ativados	16
<b>Tabela 4.1</b> Composição do meio de cultivo PYG	22
<b>Tabela 4.2</b> Ensaio em meio de cultivo PYG	23
<b>Tabela 4.3</b> Ensaio em acetato de sódio	24
<b>Tabela 4.4</b> Montagem dos reatores anaeróbios em batelada	28
<b>Tabela 5.1</b> Análises de sólidos dos inóculos	31
<b>Tabela 5.2</b> Caracterização do resíduo industrial usado nos ensaios de geração de biogás	39
<b>Tabela 5.3</b> Turbidez nos reatores anaeróbios de diluição seriada.	40
<b>Tabela 5.4</b> pH no final na operação dos reatores anaeróbios.	49

## LISTA DE FIGURAS

		p.
<b>Figura 2.1</b>	Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia	17
<b>Figura 4.1</b>	Esquema operacional da etapa 4.1. Teste preliminar para determinação de inóculo	21
<b>Figura 4.2</b>	Esquema operacional da etapa 4.2. Caracterização do resíduo industrial	25
<b>Figura 4.3</b>	Purificação celular por diluições seriadas: (1) <i>headspace</i> : (2) inóculo em meio de cultivo	26
<b>Figura 4.4</b>	Esquema operacional da etapa 4.3. Ensaios de geração de biogás em reatores anaeróbios operados em batelada	27
<b>Figura 4.5</b>	Sistema de reatores anaeróbios com deslocamento de volume	29
<b>Figura 5.1</b>	Microscopia de luz comum, com técnica de coloração de Gram, nos inóculos	32
<b>Figura 5.2</b>	Biogás produzido no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com glicose	33
<b>Figura 5.3</b>	Consumo de açúcares totais no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com glicose	34
<b>Figura 5.4</b>	pH no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com glicose	35
<b>Figura 5.5</b>	Biogás produzido no final da operação dos anaeróbios alimentados com acetato de sódio	36
<b>Figura 5.6</b>	Consumo de ácido acético no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com acetato de sódio	37
<b>Figura 5.7</b>	pH para no final da operação dos anaeróbios alimentados com acetato de sódio	38
<b>Figura 5.8</b>	Aparência o resíduo da indústria de desinfestantes ambientais	39
<b>Figura 5.9</b>	Reatores anaeróbios de diluição seriada para purificação do resíduo industrial	40
<b>Figura 5.10</b>	Crescimento celular das culturas isoladas em reatores anaeróbios para diferentes fontes de carbono	41
<b>Figura 5.11</b>	Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) em meio de cultivo do resíduo reativado	42
<b>Figura 5.12</b>	Microscopia de contraste de fase (aumento 1000 X) em meio de cultivo do resíduo reativado	42
<b>Figura 5.13</b>	Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) em meio de cultivo após purificação celular (diluição $10^{-7}$ )	43
<b>Figura 5.14</b>	Microscopia de contraste de fase (aumento 1000 X) em meio de cultivo após purificação celular (diluição $10^{-7}$ )	43
<b>Figura 5.15</b>	Variação temporal da DQO nos reatores anaeróbios	44
<b>Figura 5.16</b>	Variação temporal dos consumos de açúcares totais nos reatores anaeróbios	46

<b>Figura 5.17</b>	Varição temporal da produção de biogás e gás metano nos reatores anaeróbios	47
<b>Figura 5.18</b>	Composição do gás gerado nos reatores anaeróbios	48
<b>Figura 5.19</b>	Concentração de sólidos nos reatores anaeróbios	50
<b>Figura 5.20</b>	Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) dos reatores anaeróbios da Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial)	51
<b>Figura 5.21</b>	Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) dos reatores anaeróbios da Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial)	52
<b>Figura 5.22</b>	Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) dos reatores anaeróbios da Condição 4 (100% resíduo industrial)	52

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Inseticidas</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Processo anaeróbio de geração de biogás</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Reatores anaeróbios em batelada</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Específicos</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Teste preliminar para determinação de inóculo</b>	<b>21</b>
<i>4.1.1</i>	<i>Fontes de inóculo</i>	<i>21</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Reativação</i>	<i>22</i>
<i>4.1.3</i>	<i>Geração de biogás</i>	<i>22</i>
<u>4.1.3.1</u>	<u>Cultivo em PYG e agente tamponante</u>	<u>22</u>
<u>4.1.3.2</u>	<u>Cultivo em acetato de sódio e agentes tamponantes</u>	<u>23</u>
<i>4.1.4</i>	<i>Consumo das fontes de carbono adicionadas</i>	<i>24</i>
<i>4.1.5</i>	<i>Análise da composição do biogás</i>	<i>24</i>
<i>4.1.6</i>	<i>Seleção do inóculo</i>	<i>24</i>
<b>4.2</b>	<b>Resíduo industrial</b>	<b>25</b>
<i>4.2.1</i>	<i>Caracterização físico-química</i>	<i>25</i>
<i>4.2.2</i>	<i>Reativação celular de bactérias anaeróbias presentes no resíduo industrial</i>	<i>26</i>
<i>4.2.3</i>	<i>Caracterização nutricional</i>	<i>26</i>
<b>4.3</b>	<b>Ensaio de geração de biogás em reatores anaeróbios operados em batelada</b>	<b>27</b>
<i>4.3.1</i>	<i>Reativação do inóculo selecionado</i>	<i>27</i>
<i>4.3.2</i>	<i>Montagem dos reatores anaeróbios</i>	<i>27</i>
<i>4.3.3</i>	<i>Análises físico-químicas e microbiológicas</i>	<i>28</i>
<u>4.3.3.1</u>	<u>Quantificação do biogás gerado</u>	<u>29</u>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Fontes de inóculo</b>	<b>31</b>
<i>5.1.1</i>	<i>Caracterização das fontes de inóculo</i>	<i>31</i>
<i>5.1.2</i>	<i>Testes de geração de biogás para os inóculos (1), (2), (3) e (4)</i>	<i>32</i>
<u>5.1.2.1</u>	<u>Cultivo em meio PYG com tamponantes</u>	<u>32</u>

5.1.2.2	<u>Cultivo em acetato de sódio com tamponantes</u>	35
5.1.2	<i>Seleção da fonte de inóculo</i>	38
<b>5.2</b>	<b>Resíduo industrial</b>	<b>39</b>
5.2.1	<i>Caracterização do resíduo industrial</i>	39
5.2.2	<i>Reativação e purificação celular</i>	40
5.2.3	<i>Caracterização nutricional</i>	40
5.2.4	<i>Caracterização morfológica</i>	41
<b>5.3</b>	<b>Ensaio de geração de biogás em reatores anaeróbios batelada</b>	<b>44</b>
5.3.1	<i>Consumo do substrato orgânico</i>	44
5.3.2	<i>Consumo de açúcares totais</i>	45
5.3.3	<i>Quantificação do biogás gerado</i>	46
5.3.4	<i>Composição do biogás gerado</i>	47
5.3.5	<i>pH</i>	49
5.3.6	<i>Análises de sólidos</i>	49
5.3.5	<i>Análises microscópicas</i>	51
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A matriz energética mundial é composta por cerca de 80% de fontes não renováveis, como petróleo e carvão mineral (BRASIL, 2015). Este cenário tem contribuído para a degradação ambiental e alterações climáticas globais. Buscar energias alternativas de fontes renováveis é essencial para a preservação ambiental.

A preocupação com os impactos da poluição na saúde tem se tornado urgente e se impõe, pois, com o crescimento populacional e a migração da população das zonas rurais para grandes centros urbanos, a poluição ambiental gerada pelas atividades humanas causa impactos sobre o próprio homem (SALDIVA; COELHO, 2013).

No nível global e durante o último século, o aumento da temperatura na superfície terrestre – fenômeno conhecido como aquecimento global – pode ser devido ao aumento de emissões de gases do efeito estufa, especialmente o dióxido de carbono, oriundo da queima de combustíveis fósseis.

Encontrar soluções alternativas para a geração de energia é uma das principais soluções para reverter esse cenário. Segundo Braga et al (2005), as principais fontes renováveis de energia são: energia das marés, energia geotérmica, energia solar, biocombustível líquido, gás hidrogênio e biogás. Este último é definido como: “a energia que pode ser obtida do gás natural resultante da decomposição anaeróbia de compostos orgânicos”.

A digestão anaeróbia pode ser considerada como um ecossistema onde diversos grupos de microrganismos trabalham interativamente na conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, além de novas células bacterianas. (CHERNICHARO, 2007).

O biogás pode ser considerado um potencial biocombustível por ser composto principalmente de metano, gás carbônico e hidrogênio, contribuindo para o reaproveitamento de resíduos sólidos na geração de energia. O hidrogênio possui um poder calorífico aproximadamente cinco vezes maior do que o etanol, o metano possui um poder calorífico cerca de duas vezes maior que o etanol (LAMAISON et al., 2009). Hidrogênio, Metano e Etanol liberam respectivamente 50,0; 26,5 kJ/g e 121 kJ/g (BARTACEK et al. 2007; WANG e WAN, 2009).

Resíduos agrícolas, domésticos e em alguns casos industriais contém matéria orgânica prontamente assimilável que podem ser utilizados como substrato (OLIVER et al., 2008; YASMIN et al., 2000; LAMAISON et al., 2009). De acordo com Chernicharo (2007), a digestão anaeróbia tem sido muito aplicada para o tratamento de efluentes de indústrias agrícolas, alimentícias e de bebidas.

Os efluentes industriais podem ser biodegradáveis até completamente não biodegradáveis, pois contêm substâncias que conferem qualidades físicas, químicas e biológicas correspondentes a sua utilização e geração industrial (PIRES; ZAMARIOLLI; del NERY, 2013).

Uma gama significativa de compostos químicos sintéticos é continuamente colocada à disposição no mercado para satisfazer a demanda de produtos para o atendimento das necessidades humanas, como fabricação de medicamentos, cosméticos, produtos de limpeza, fertilizantes, inseticidas, herbicidas, e muitos outros, que podem exercer efeitos tóxicos sobre a saúde humana e animal (HESPANHOL, 2013). O tratamento prévio do resíduo destas indústrias é essencial para a manutenção da qualidade ambiental.

Entre os resíduos industriais destacam-se os da indústria de inseticidas que, por sua vez, são substâncias que matam diretamente insetos, e têm sido usados há milhares de anos pela humanidade, principalmente para o controle de vetores de doenças. O mercado de inseticidas no Brasil teve um crescimento de 240% nos últimos cinco anos (NEVES, 2012). Segundo Baird (2002), os pesticidas inorgânicos e organometálicos, não biodegradáveis, foram muito utilizados, e são tóxicos para seres humanos e outros mamíferos. Em vista disso, pesticidas orgânicos foram projetados para serem biodegradáveis, porém apresentam efeitos tóxicos para animais e vegetais. Efluentes de tais fontes podem conter níveis de contaminantes de até 500 mg.l<sup>-1</sup> (CHIRON et. al., 2000).

Em vista disso, os resíduos das indústrias de inseticidas podem apresentar grau elevado de tratamento na remoção de sua toxicidade e adequação aos padrões de lançamento da Legislação Ambiental. Os processos biológicos anaeróbios são mais vantajosos, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente transformando compostos orgânicos tóxicos em biogás, com custos relativamente reduzidos (FREIRE et al., 2000).

Gerar biogás, a partir de águas residuárias provenientes da fabricação de inseticidas, contribuirá com a inovação na pesquisa de produção de biogás de segunda geração, onde tais efluentes poderão ser reutilizados de maneira sustentável. A realização de novos estudos é uma possibilidade de gerir concomitantemente, redução de custos e geração de energia limpa.

Efluentes industriais merecem destaque como o caso de resíduos da fabricação de inseticidas utilizados no combate a pragas urbanas como ratos, baratas e formigas de empresa local da Região Central do Estado de S. Paulo.

Portanto, a busca de conhecimento biotecnológico visando o aproveitamento de resíduos e geração de coprodutos de valor agregado é uma necessidade atual e alternativa em função da escassez de energia. Nesse sentido, esse projeto de pesquisa visou verificar o potencial da produção biológica de biogás em reatores anaeróbios em batelada, operados a 37°C, alimentados com efluentes de indústrias de inseticidas locais, além de aplicar metodologias clássicas em Microbiologia com a finalidade de purificar, enriquecer e caracterizar os principais microrganismos envolvidos em tais processos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Inseticidas

Os pesticidas são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira, como insetos (BAIRD, 2002). Compostos orgânicos não biodegradáveis, como defensivos agrícolas, pesticidas, plásticos, entre outros, mesmo em concentrações reduzidas, estão associados a problemas de toxicidade (SPERLING, 2005). Andreoli et al (2001) afirmam que, todos os pesticidas produzem, pelo menos, alguma toxicidade no ser humano.

Determinados despejos industriais possuem constituintes tóxicos ou inibidores, que podem afetar ou inviabilizar o tratamento biológico (SPERLING, 2005). Na presença de compostos tóxicos, o tratamento biológico deve ser precedido de etapa para remoção desses componentes ou, quando possível, de adaptação dos microrganismos à presença dos tóxicos (PIRES; ZAMARIOLLI; del NERY, 2013).

Resíduos de indústrias de inseticidas podem conter Hidrametilnona, Imidaclopride, Indoxacarbe, dentre outros. Segundo dados da ANVISA (2016), Hidrametilnona pertence ao grupo químico Amidinohidrazona, é classificado como inseticida e como toxicologia de Classe III – medianamente tóxico, é autorizado o comércio livre, para uso domissanitário, de iscas e gel, com concentração máxima de 1,65% e 2,0%, respectivamente. Imidaclopride pertence ao grupo químico Neonicotinóide, classificado como inseticida e de classificação toxicológica: Classe III - medianamente tóxico, a venda direta ao consumidor é autorizada em gel com concentração máxima permitida de 2,15% e granulado com concentração máxima de 0,5% (ANVISA, 2016). Tal produto é proibido na França, por ser altamente tóxico para os insetos e atingir águas fluviais subterrâneas, no caso de toxicidade em humanos, o produto é moderadamente tóxico. Indoxacarbe pertence ao grupo químico: Oxadiazina, classificado como inseticida, cupingicida e formicida e de classificação toxicológica: Classe I – extremamente tóxico; sua venda livre é autorizada em gel e isca granulada para jardinagem amadora, em concentrações máximas de 0,6% e 0,045%, respectivamente, e em pasta em embalagem porta-isca com 0,6 % de concentração máxima (ANVISA, 2016). Nenhum dos compostos tóxicos citados é inofensivo à saúde humana e ao meio ambiente, podendo estar presentes no resíduo industrial. Deste modo, procurar formas de tratamento eficazes é de extrema importância ambiental.

## 2.2. Processo anaeróbio de geração de biogás

A degradação da matéria orgânica gera o biogás, que pode ser obtido a partir de resíduos agrícolas, domésticos e em alguns casos até industriais (OLIVER et al, 2008; YASMIN et al., 2000; LAMAISON et al., 2009). É considerado um potencial biocombustível, contribuindo para o reaproveitamento de resíduos sólidos na geração de energia. É formado basicamente por metano, dióxido de carbono e nitrogênio, oxigênio e gás sulfídrico em concentrações reduzidas (Tabela 2.1).

Tem como componentes os gases metano e hidrogênio, que apresentam calor de combustão elevado de 50 e 121 kJ/g, respectivamente, e mais energéticos que os combustíveis usados largamente no Brasil como o etanol (26,5 kJ/g) e a própria gasolina (48 kJ/g), além de esse último ser recurso não renovável (WANG e WAN, 2009). Segundo Brack (2012), o poder calorífico do biogás é da ordem de 5.000 a 7.000 kcal/m<sup>3</sup> e comparado com outras fontes de energia 1 m<sup>3</sup> de biogás equivale a: 0,61 L de gasolina; 0,58 L de querosene; 0,45 L de gás de cozinha ou ainda 1,5 kg de lenha. Já Andreoli et al (2001), afirmam que o poder calorífico do biogás com cerca de 70% de metano é de 23.380 kJ/m<sup>3</sup>, em comparação ao gás natural (composto por metano, butano e propano) que possui 37.300 kJ/m<sup>3</sup>.

**Tabela 2.1.** Composição típica do biogás oriundo da digestão anaeróbia de lodos ativados.

Gás	% (volume/volume)
Metano	62 - 70
Gás carbônico	30 - 38
Gás sulfídrico	50 - 3.000 ppm
Nitrogênio	0,05 – 1,0
Oxigênio	0,022
Hidrogênio	<0,01
Vapor d'água	Saturação

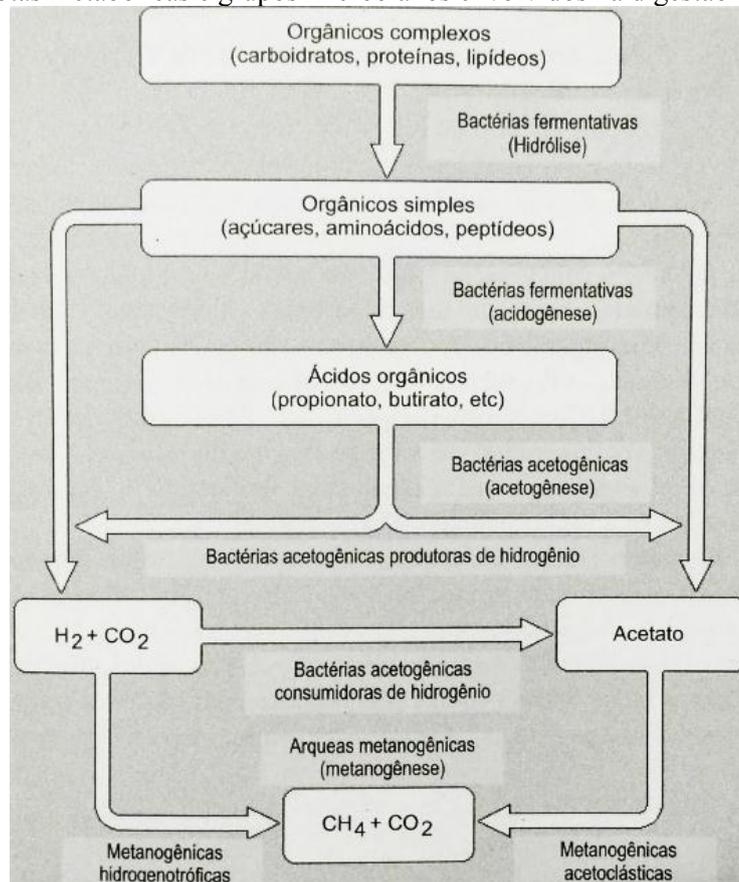
Fonte: ANDREOLI et al, 2001.

O processo anaeróbio ocorre em fases distintas, descritas a seguir, conforme a Figura 2.1 (CHERNICHARO, 2007; ANDREOLI et al, 2001):

- Hidrólise - As bactérias fermentativas quebram compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas, lipídios) em compostos solúveis (ácidos graxos, açúcares, aminoácidos), álcoois dióxido de carbono e amônia. Os microrganismos fermentativos são os primeiros a atuar na etapa sequencial de degradação, e são os que mais se beneficiam energeticamente.

- Acidogênese – As bactérias acidogênicas convertem compostos solúveis em compostos orgânicos de cadeia curta, tendo como principais produtos ácidos orgânicos voláteis, gás carbônico, hidrogênio e amônia. Durante essa fase, a demanda química de oxigênio (DQO) se mantém inalterada, não existindo estabilização da matéria orgânica.
- Acetogênese - As bactérias acetogênicas consomem os ácidos graxos voláteis e outros compostos orgânicos, formados na acidogênese, produzindo ácido acético, acetatos, hidrogênio gasoso e gás carbônico.
- Metanogênese - Por fim, dois grupos de microrganismos formadores de metano entram em ação: arqueias metanogênicas autotróficas (ou hidrogenotróficas) que produzem de metano a partir de dióxido de carbono e hidrogênio; e arqueias metanogênicas acetoclásticas, que produzem metano a partir de acetatos.
- Sulfetogênese – Em concentrações elevadas de sulfato no meio, são as bactérias sulforredutoras que consomem o acetato e o hidrogênio, e produzem sulfetos. São competidoras com as arqueias metanogênicas, sendo a concentração de sulfato que vai determinar qual o processo dominante na degradação anaeróbia.

**Figura 2.1.** Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: CERNICHARO, 2007.

Geralmente, cerca de 70% do metano produzido é oriundo do processo metabólico dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, que utilizam sais de acetato ou ácido acético como substrato, enquanto os outros 30% são produzidos por microrganismos hidrogenotróficos a partir da redução do dióxido de carbono (AQUINO et al, 2007; ANDREOLI et al, 2001).

Microrganismos metanogênicos estão incluídos no Domínio *Archaea*, procarióticos que, em sua maioria, possuem metabolismo anaeróbico obrigatório (VARESCHE; SAKAMOTO; OLIVEIRA, 2013). De acordo com Chernicharo (2007), as arqueias são distintas das bactérias típicas, pois, possuem vários atributos bioquímicos e estruturais únicos, que as adaptaram para sobreviver em *habitats* extremos. O gênero *Methanosaeta* utiliza-se exclusivamente do acetato como substrato, enquanto que arqueias do gênero *Methanosarcina*, são mais versáteis por serem capazes consumir hidrogênio e compostos metilados para produção do metano (CHERNICHARO, 2007).

Os microrganismos no processo são interdependentes. Bactérias responsáveis por um estágio do processo dependem da ação das bactérias responsáveis pelo estágio anterior para sua subsistência, e influenciam a atividade dos organismos atuantes nos estágios subsequentes (DEZOTTI, 2008). Desta forma, é essencial que as condições do meio estejam adequadas para o desenvolvimento e manutenção dos microrganismos. Bactérias anaeróbias são sensíveis a uma série de substâncias que, dependendo da concentração, podem paralisar completamente o processo de digestão, incluindo hidrocarbonetos, compostos organoclorados, agentes oxidantes, metais pesados, entre outros (ANDREOLI et al, 2001).

A geração do biogás por processos anaeróbios é dependente de parâmetros tais como tipo de substrato, temperatura e pH. De acordo com Andreoli et al (2001), o pH ideal do processo anaeróbico é que se mantenha próximo à neutralidade. Acidificação do meio inibe as arqueias acetogênicas, que não produzem acetato, cessando a produção de metano. Já a temperatura considerada ótima deve ser mantida em torno de 35°C, fundamental para o bom desempenho e produção de gás metano (ANDREOLI et al, 2001; CHERNICHARO, 2007; SOUTO, et al., 2009).

### **2.3. reatores anaeróbios em batelada**

Os sistemas de digestão anaeróbia podem ser divididos em sistemas de fluxo contínuo e sistemas em batelada (SOUTO; POVINELLI, 2013). No reator de batelada não há fluxo de entrada ou de saída, o conteúdo do reator é misturado completamente e todos os

elementos são expostos ao tratamento por um tempo igual à permanência do substrato no reator (SPERLING, 1996).

Segundo Rodrigues (2016), reatores em batelada são usados em escala laboratorial na maioria dos estudos, pois trazem a vantagem de serem mais simples, facilmente operados e flexíveis, resultando na ampla utilização de reatores em batelada para a determinação do potencial de geração de biohidrogênio a partir de substratos orgânicos. Desta forma, no presente estudo, os reatores em batelada também foram utilizados para a determinação do potencial de geração de gás metano a partir de águas residuárias industriais, contendo substratos orgânicos.

O tratamento biológico utiliza-se da ação metabólica de microrganismos para degradar os compostos. No tratamento biológico de esgotos, os microrganismos são responsáveis pelas reações de conversão da matéria orgânica e inorgânica (SPERLING, 2005). O principal produto dos processos biológicos de tratamento de rejeitos é a despoluição ambiental, uma vez que os compostos orgânicos poluentes são estabilizados pela ação de microrganismos, em ambiente favorável, fornecido pelo reator biológico (VARESCHE; SAKAMOTO; OLIVEIRA, 2013)

Os reatores anaeróbios são utilizados como forma de tratamento de efluentes domésticos, agrícolas e industriais, por fornecerem resultados satisfatórios na degradação dos compostos orgânicos. Segundo Sperling (2005), apresentam uma taxa de remoção de matéria orgânica de 60 a 90% para o tratamento de esgotos domésticos. Além de apresentar diversas vantagens em relação a outros tipos de tratamento, como baixo consumo de energia, tolerância a elevadas cargas orgânicas, aplicabilidade em pequena e grande escala, possibilidade de preservação da biomassa sem alimentação do reator, entre outros (CHERNICHARO, 2007). Também geram quantidades reduzidas de sólidos (lodo), por transformar grande parte do conteúdo orgânico em biogás (PIRES; ZAMAROLLI; del NERY, 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar o potencial da geração de biogás em reatores anaeróbios em batelada a partir de resíduos de indústrias de inseticidas.

#### **3.1. Específicos**

- a. Caracterizar os resíduos de inseticidas que foram utilizados como substrato orgânico para a geração do biogás;
- b. Investigar a produção de biogás para proporções crescentes de resíduos de inseticidas em reatores anaeróbios em batelada com consórcios anaeróbios enriquecidos;
- c. Relacionar o consumo do substrato orgânico e geração de biogás pelo consórcio de bactérias anaeróbias, durante operação dos reatores anaeróbios.

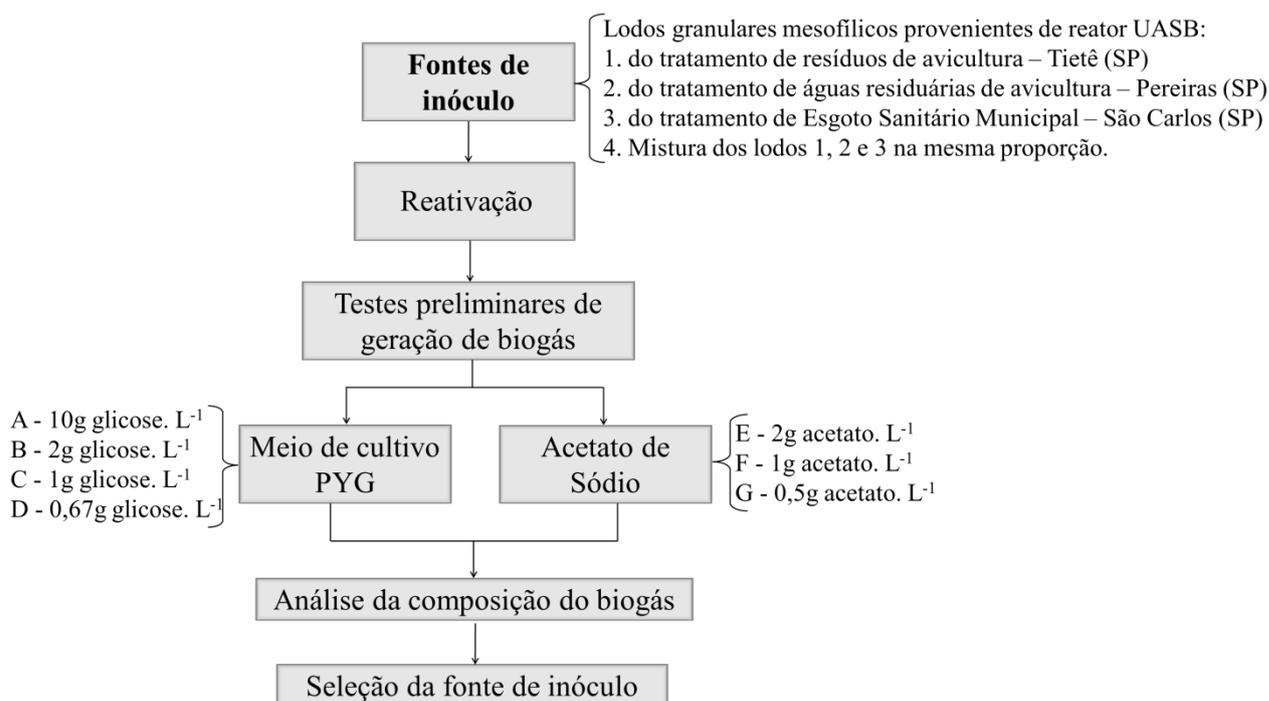
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Essa pesquisa foi realizada em três etapas: Teste preliminar para determinação de inóculo; Caracterização do resíduo e Operação dos reatores anaeróbios em batelada, descritos a seguir.

### 4.1. Teste preliminar para determinação de inóculo

As atividades realizadas incluíram: seleção das fontes de inóculo, reativação em meio de cultivo, testes de geração de biogás em cultivo com meio complexo e com acetato de sódio, análise da composição do biogás e seleção da fonte de inóculo com resultados satisfatórios (Figura 4.1).

**Figura 4.1.** Esquema operacional da etapa de teste preliminar para determinação de inóculo



#### 4.1.1. Fontes de inóculo

Foram testadas, separadamente, as fontes de inóculo provenientes de reator de fluxo ascendente de manta de lodo, tipo UASB (do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*):

1. Lodo granular mesofílico do tratamento de resíduos de avicultura – localizado em Tietê – SP.

2. Lodo granular mesofílico do tratamento de águas residuárias de avicultura – localizado em Pereiras – SP.

3. Lodo granular mesofílico do tratamento de Esgoto Sanitário Municipal – localizado em São Carlos – SP;

4. Mistura dos lodos 1, 2 e 3 na mesma proporção.

Para facilitar a descrição os inóculos serão denominados respectivamente (1), (2), (3) e (4). Foi realizada caracterização dos inóculos testados, através de análises de sólidos totais, e de análises microscópicas.

Durante o teste preliminar foi eleito o melhor inóculo para a produção do biogás e partir dessa escolha seguiu-se com a operação com reatores anaeróbios em batelada com concentrações crescentes dos resíduos.

#### 4.1.2. Reativação

Os inóculos (1), (2), (3) e (4) foram previamente homogeneizados, separadamente, com auxílio de cadinho e pistilo com o objetivo de desagregar os grânulos para homogeneizar a amostra. A seguir as amostras (20%) foram transferidas para reatores anaeróbios em batelada contendo meio de cultivo PYG (do inglês *Peptone Yeast Extract Glucose Broth*), (Tabela 4.1), para a reativação das bactérias anaeróbias presentes na amostra, mantidos a 37°C durante 15 dias.

**Tabela 4.1.** Composição do meio de cultivo PYG.

Composto	Quantidades (g.l <sup>-1</sup> )
Glicose	10,0
Extrato de levedura	5,0
Extrato de carne	5,0
Peptona	5,0
pH inicial 7,0	

#### 4.1.3. Geração de biogás

As fontes de inóculo utilizadas foram provenientes dos processos de reativação. Os inóculos reativados foram ressuspensos a 4°C, 9000 rpm, durante 10 minutos e utilizados como biomassa nos reatores anaeróbios em batelada, separadamente.

##### 4.1.3.1. Cultivo em PYG e agente tamponante

O meio de cultivo utilizado nos reatores anaeróbios em batelada foi meio complexo não seletivo (Tabela 4.1) para favorecer o crescimento dos microrganismos presentes. As

concentrações dos componentes foram variadas, para avaliar qual é condição ideal na produção de biogás. As concentrações de meio de cultivo testadas foram:

- A – 10g de glicose.l<sup>-1</sup>, 5g de peptona. l<sup>-1</sup>, 5g de extrato de levedura. l<sup>-1</sup>, 5g de extrato de carne. l<sup>-1</sup>;
- B – 2g de glicose.l<sup>-1</sup>, 1g de peptona. l<sup>-1</sup>, 1g de extrato de levedura. l<sup>-1</sup>, 1g de extrato de carne. l<sup>-1</sup>;
- C – 1g de glicose.l<sup>-1</sup>, 0,5g de peptona. l<sup>-1</sup>, 0,5g de extrato de levedura. l<sup>-1</sup>, 0,5g de extrato de carne. l<sup>-1</sup>;
- D – 0,67g de glicose.l<sup>-1</sup>, 0,33g de peptona. l<sup>-1</sup>, 0,33g de extrato de levedura. l<sup>-1</sup>, 0,33g de extrato de carne. l<sup>-1</sup>.

Reatores anaeróbios em batelada (100ml) foram alimentados com 50ml de meio de cultivo de cada concentração A, B, C e D separadamente, em duplicata, com *headspace* (50ml) de N<sub>2</sub> (100%) para garantir as condições de anaerobiose. Foram utilizados meios com adição de agentes tamponantes [0,4g.l<sup>-1</sup> de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,4g.l<sup>-1</sup> de hidrogenofosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), (DOLFING e BLOEMAN, 1985)], em pH 7, à 37°C, durante 15 dias. Em cada reator foram adicionados 20% de inóculo, usando os inóculos (1), (2), (3) e (4), separadamente, nos cultivos A, B, C e D, em duplicata. Desta forma foram monitorados 16 ensaios (Tabela 4.2.).

**Tabela 4.2.** Ensaios em meio de cultivo PYG

Fonte de inóculo	Meio de cultura PYG			
	A	B	C	D
1	A1	B1	C1	D1
2	A2	B2	C2	D2
3	A3	B3	C3	D3
4	A4	B4	C4	D4

#### 4.1.3.2. Cultivo em acetato de sódio e agentes tamponantes

O cultivo em acetato de sódio foi utilizado objetivando favorecer a geração de gás metano, para avaliar a potencialidade dos inóculos quanto à capacidade de produção do biogás, uma vez que cerca de 70% do metano produzido é oriundo do processo metabólico dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, que utilizam sais de acetato ou ácido acético como substrato, enquanto que 30% são produzidos por microrganismos hidrogenotróficos a partir da redução do dióxido de carbono, conforme descrito anteriormente.

As concentrações testadas foram:

- E – 2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>
- F – 1g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>
- G – 0,5g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>

Reatores anaeróbios em batelada (100ml) foram alimentados contendo 50ml de substrato nas condições E, F e G, com 20% de cada um dos inóculos (1), (2), (3) e (4), separadamente; com *headspace* preenchidos com N<sub>2</sub> (100%) para garantir as condições de anaerobiose; adição de agentes tamponantes [0,4g.l<sup>-1</sup> de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,4g.l<sup>-1</sup> de hidrogenofosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), (DOLFING e BLOEMAN, 1985)]; pH inicial 7,0, mantidos a 37°C, durante 15 dias. Assim, foram monitorados 12 ensaios em duplicata (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Ensaios em acetato de sódio

Fonte de inóculo	Concentrações de Acetato de Sódio		
	E	F	G
1	E1	F1	G1
2	E2	F2	G2
3	E3	F3	G3
4	E4	F4	G4

#### 4.1.4. Consumo das fontes de carbono adicionadas

Para as condições A, B, C e D, foram analisados os consumos de glicose, de acordo com Dubois et al, (1956) e nas condições E, F e G, foram analisados os consumos de acetato de sódio por cromatografia gasosa (ADORNO et al., 2014).

#### 4.1.5. Análise da composição do biogás

A composição do biogás, em gases metano, carbônico e oxigênio, de cada reator, foi avaliada em equipamento portátil LANDTEC GEM 2000<sup>®</sup>, com precisão de 3% (ANTONIO, 2012) no final da operação dos reatores anaeróbios das condições testadas (A, B, C, D, E, F e G).

#### 4.1.6. Seleção do inóculo

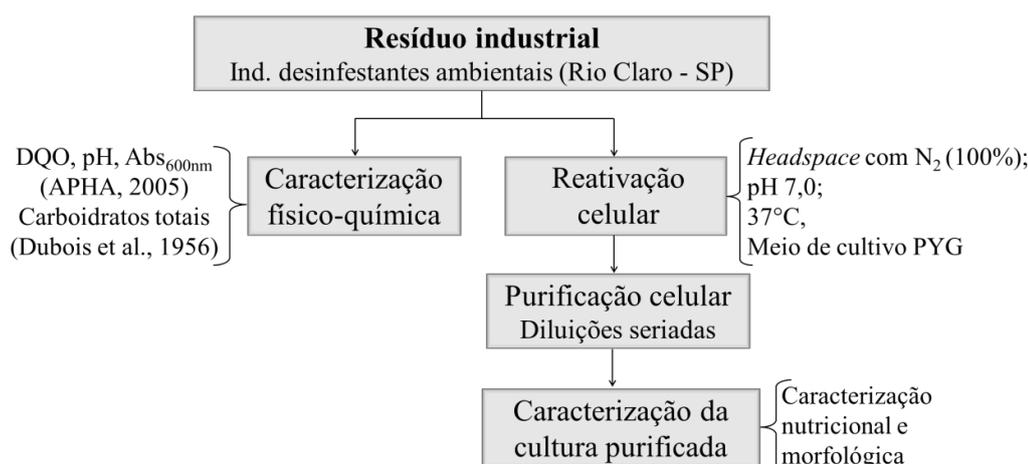
O inóculo que apresentou os melhores resultados para a geração de biogás nas condições testadas em ambos substratos foi escolhido para os testes posteriores com resíduos de indústrias de inseticidas.

## 4.2. Resíduo industrial

O resíduo industrial foi cedido por empresa especializada em desinfestantes ambientais para o combate a pragas urbanas (formicida, baraticida e raticida), localizada no Distrito Industrial do município de Rio Claro - SP. Esta indústria fabrica géis para o controle das pragas urbanas. Segundo dados fornecidos pela indústria, os ingredientes ativos utilizados nos géis são: Hidrametilnona (tec. 95 %); Imidaclopride (tec. 97%); Indoxacarbe (tec. 95%). As concentrações dos ingredientes ativos nas formulações de géis variam de 0,6% a 2,15%. A frequência de produção do efluente é de aproximadamente 2 a 3 m<sup>3</sup> mensais (projeção).

Para realização desta etapa foram executadas as atividades: obtenção do resíduo industrial, caracterização físico-química e reativação celular, purificação celular através de diluições seriadas e caracterização da cultura purificada, com análises nutricionais e morfológicas (Figura 4.2).

**Figura 4.2.** Esquema operacional da etapa de Caracterização do resíduo industrial



### 4.2.1. Caracterização físico-química

As caracterizações físico-químicas do resíduo foram realizadas por análises de: Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH, turbidez [absorbância (ABS 600nm)]; sólidos totais, fixos e voláteis segundo APHA, 2005 e; açúcares totais conforme Dubois et al. (1956).

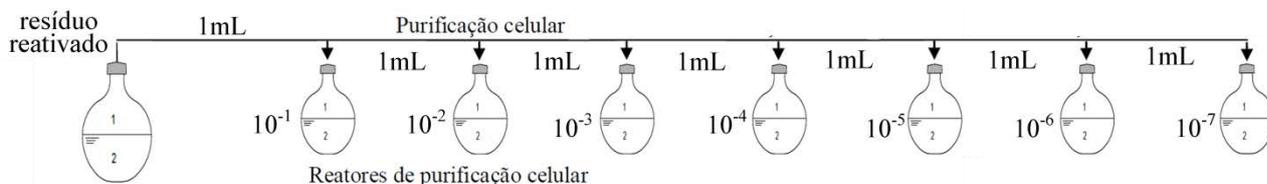
### 4.2.2. Reativação celular de bactérias anaeróbias presentes no resíduo industrial

Um volume de 1 ml do resíduo bruto foi adicionado em meio de cultivo complexo (PYG - Tabela 4.1) com solução tampão bicarbonato de sódio (10g.l<sup>-1</sup>), em reatores anaeróbios em batelada (100ml) com *headspace* de N<sub>2</sub> (100%) (50ml), pH 7,0, a 37°C por 144 hs, com objetivo de reativar bactérias anaeróbias presentes.

O meio de cultivo (Tabela 4.1) foi preparado com adição dos reagentes e distribuídos (50ml) em frascos de antibiótico (100ml) sob fluxo de N<sub>2</sub> no *headspace* dos frascos (50ml), durante 5 minutos, para efetuar a troca gasosa e garantir as condições de anaerobiose. Os reatores foram fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio e a esterilização foi feita em autoclave (20 min, 120°C). A seguir, 1ml de resíduo foi adicionado, com auxílio de agulhas e seringas estéreis, em condições assépticas, ao meio de cultivo estéril, em triplicata de reatores anaeróbios que foram mantidos a 37°C por 7 dias. O processo de reativação foi monitorado com análises esporádicas de turbidimetria, microscopia óptica de luz comum e de contraste de fase.

A seguir, foram realizadas sete diluições seriadas (Figura 4.3) a partir da reativação celular com o objetivo de purificar os consórcios bacterianos, em meio de cultivo (Tabela 4.1), *headspace* de N<sub>2</sub> (100%), pH 7,0 e mantidos a 37°C, por 72 horas. Foi avaliado o crescimento celular por turbidimetria (ABS 600 nm) ao final da operação.

**Figura 4.3.** Purificação celular por diluições seriadas: (1) *headspace*: (2) inóculo em meio de cultivo.



Fonte: adaptado de Rodrigues (2016).

#### 4.2.3. Caracterização nutricional

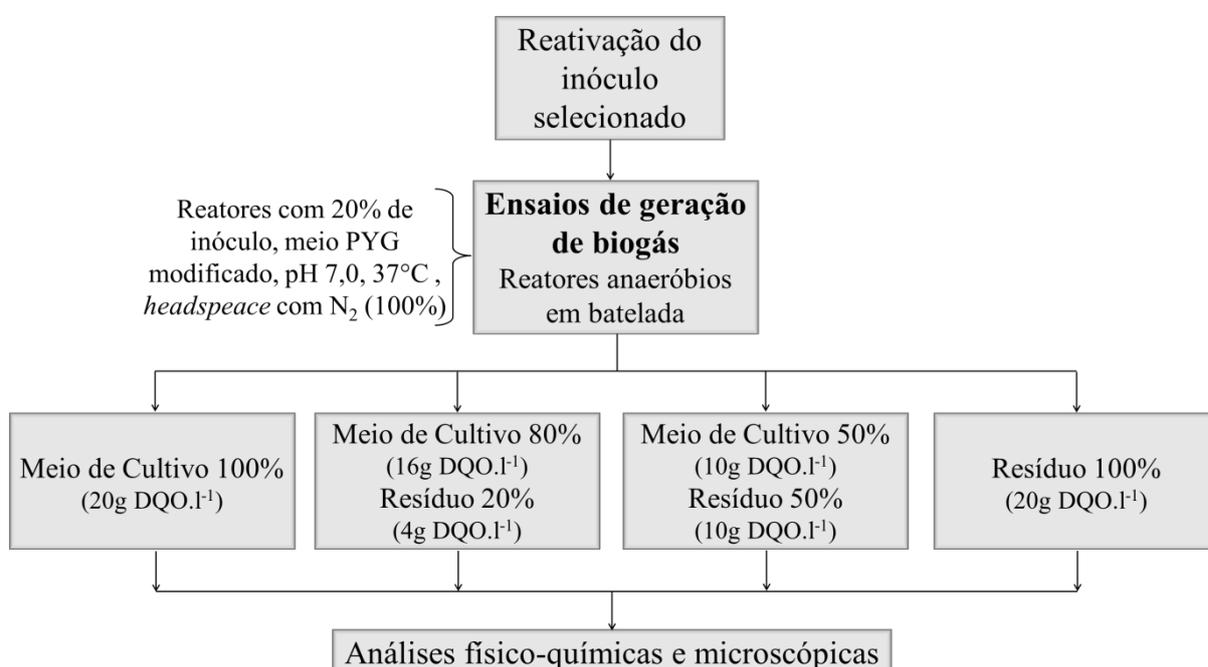
Foi realizada uma avaliação nutricional do consórcio de bactérias presentes no resíduo, após a purificação celular. A biomassa purificada advinda da diluição 10<sup>-5</sup> (1ml) foi adicionada em meio de cultivo PYG (Tabela 4.1) modificado, variando-se as fontes de carbono (10g.l<sup>-1</sup>) separadamente em: glicose, lactose, maltose, dextrose, xilose, sacarose, frutose e glicerol, em duplicata (MAINTINGUER et al., 2015). Essa avaliação nutricional foi preparada em reatores em batelada mantidos há 37°C por 144hs. Foram avaliados o crescimento celular por turbidimetria (ABS 600 nm), de acordo com APHA (2005).

### 4.3. Ensaio de geração de biogás em reatores anaeróbios operados em batelada.

A partir das gerações de biogás (Etapa 4.1) foi selecionado o inóculo [(1), (2), (3) ou (4)] que apresentou melhores resultados, em ambos os substratos (glicose e acetato de sódio).

As atividades realizadas nesta etapa foram: reativação do inóculo selecionado, montagem dos reatores anaeróbios em batelada e análises físico-químicas e microscópicas (Figura 4.4).

**Figura 4.4.** Esquema operacional da etapa de Ensaio de geração de biogás em reatores anaeróbios operados em batelada.



#### 4.3.1. Reativação do inóculo selecionado

O inóculo selecionado foi homogeneizado, com auxílio de cadinho e pistilo para desagregar os grânulos. A seguir amostras do inóculo (20% v/v) foram transferidas para reatores anaeróbios em batelada contendo meio de cultivo PYG (Tabela 4.1) com solução tampão bicarbonato de sódio (10g.l<sup>-1</sup>) e headspace de N<sub>2</sub> (100%), objetivando reativar as bactérias anaeróbias presentes. Os reatores foram mantidos a 37°C durante 14 dias.

Após esse período o inóculo reativado foi ressuspensão a 4°C, 9000 rpm, durante 10 minutos e utilizado como biomassa nos reatores anaeróbios em batelada, separadamente.

#### 4.3.2. Montagem dos reatores anaeróbios

O meio de cultivo utilizado nos reatores anaeróbios em batelada foi PYG (Tabela 4.1) com solução tampão bicarbonato de sódio ( $10\text{g.l}^{-1}$ ), utilizando-se, para tanto, as misturas contendo meio de cultivo e resíduo industrial, nos reatores anaeróbios em batelada. As proporções das misturas (meio de cultivo PYG + resíduo industrial) foram em proporções percentuais de 100, 80/20; 50/50 e 100; respectivamente, em quatro ensaios. A quantidade da fonte de carbono em cada reator foi de 20 g DQO/L para todos os ensaios. Assim, para o Ensaio 1, foi inserido como fonte de carbono, 100% de meio de cultivo, o que corresponde a  $20\text{ g.l}^{-1}$  em DQO. Para o Ensaio 2, foi adicionado 4 g DQO/L (20%) de resíduo e  $16\text{ g.l}^{-1}$  (80%) em DQO de meio de cultivo; para o ensaio 3 foram adicionados 10 g DQO/L (50%) de resíduo e  $10\text{ g.l}^{-1}$  (50%) em DQO de meio de cultivo e para o Ensaio 4,  $20\text{ g.l}^{-1}$  (100%) em DQO de resíduo; descritas na Tabela 4.4. Os reatores anaeróbios em batelada (0,5 l) foram montados em duplicatas, alimentados com 450 ml de meio reacional e a troca gasosa no *headspace* (50 ml) dos mesmos será efetuada em fluxo de  $\text{N}_2$  (100%) por 15 minutos. Na montagem dos ensaios foi adicionado ácido clorídrico ou hidróxido de sódio para ajustar o pH inicial em 7,0.

Nesses ensaios foram efetuadas as seguintes análises (inicial e final): consumo do substrato orgânico, consumo de açúcares totais, determinação do biogás gerado, pH e exames microscópicos.

**Tabela 4.4.** Montagem dos reatores anaeróbios em batelada

<i>Condições</i>	<b>ENSAIOS DE GERAÇÃO DE BIOGÁS</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>Inóculo</i>	20%	20%	20%	20%
<i>Meio de cultivo PYG</i>	100%	80%	50%	-
<i>Resíduo Industrial</i>	-	20%	50%	100%
<i>Headspace (<math>\text{N}_2</math>)</i>	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
<i>pH inicial</i>	7,0	7,0	7,0	7,0
<i>Água destilada (q.s.p.)</i>	450 ml	450 ml	450 ml	450 ml

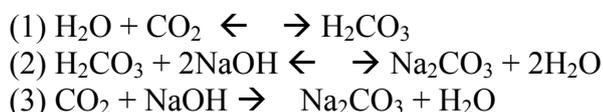
#### 4.3.3. Análises físico-químicas e microbiológicas

Foram realizadas análises de pH, DQO, consumo de açúcares totais e sólidos totais voláteis das amostras dos reatores anaeróbios no início da operação, após 24 horas e no final do experimento, conforme descrito anteriormente. Análises microscópicas da morfologia dos

microrganismos presentes foi realizada durante a operação dos reatores anaeróbios, conforme descrito anteriormente.

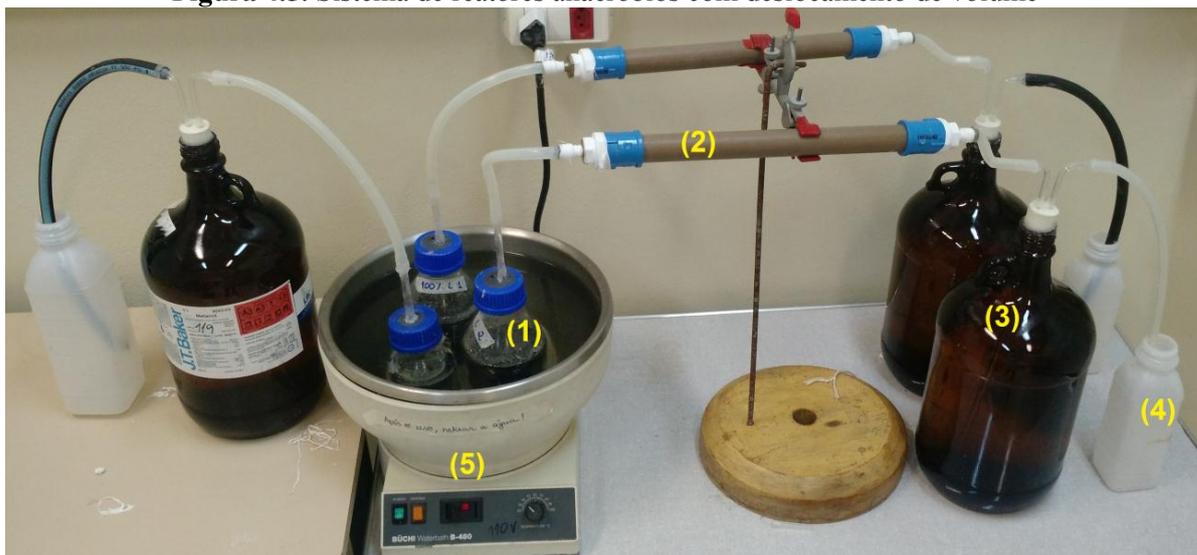
#### 4.3.3.1. Quantificação do biogás gerado

A quantificação do biogás foi realizada por deslocamento de volume, no final da operação, após duas semanas. A quantificação do metano foi realizada por processo de lavagem do biogás gerado durante a operação dos reatores anaeróbios. O procedimento da lavagem do biogás se referiu à passagem do mesmo em coluna contendo lentilhas de NaOH (98%) no qual o biogás gerado, em contato com as lentilhas, retém CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S que possivelmente possam ser produzidos, conforme reações (1), (2) e (3) de acordo com Aquino et al (2007):



As condições operacionais aplicadas foram as seguintes: (A) Reatores de produção de Biogás com as misturas propostas (meio de cultivo + resíduo), sem filtragem de gás (para quantificação do biogás) e (B) Reatores com as misturas propostas (meio de cultivo + resíduo), com filtragem em NaOH (para quantificação do gás metano). Os reatores foram mantidos a 37°C. Esse processo está ilustrado na Figura 4.5.

**Figura 4.5.** Sistema de reatores anaeróbios com deslocamento de volume



(1): Reator anaeróbio; (2) Filtro de NaOH; (3) Frasco com água para deslocamento do volume; (4) Frasco para coleta da água deslocada; (5) Equipamento de banho-maria mantido a 37°C.

Fonte: Próprio autor

A produção de gás gerada no *headspace* dos reatores foi mensurada em mililitros. E, através da equação de Clapleyron (4.1) foi transformado em número de mols.

$$P.V = n.R.T \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde:

P: pressão atmosférica padrão (1 atm = 101325 Pa);

V: volume, em m<sup>3</sup>;

n: número de mols, em mol;

R: constante universal dos gases perfeitos (8,314 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>);

T: temperatura, em Kelvin.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Fontes de inóculo

#### 5.1.1. Caracterização das fontes de inóculo

A caracterização dos inóculos, feita pela análise de sólidos (Tabela 5.1), mostra que o inóculo 1, originário de avícola, tem concentrações mais elevadas de sólidos. Contrariamente o inóculo 3, proveniente de estação de esgoto sanitário, apresentou os valores mais reduzidos. Para efeito de comparação, segundo Foresti (2013), a faixa de valores de sólidos totais característica de esgotos sanitários é em torno de 0,35 a 12g.l<sup>-1</sup>. Portanto, os inóculos possuem cerca de quatro vezes mais sólidos totais, sendo potencialmente degradadores de matéria orgânica também, até mais que os esgotos sanitários.

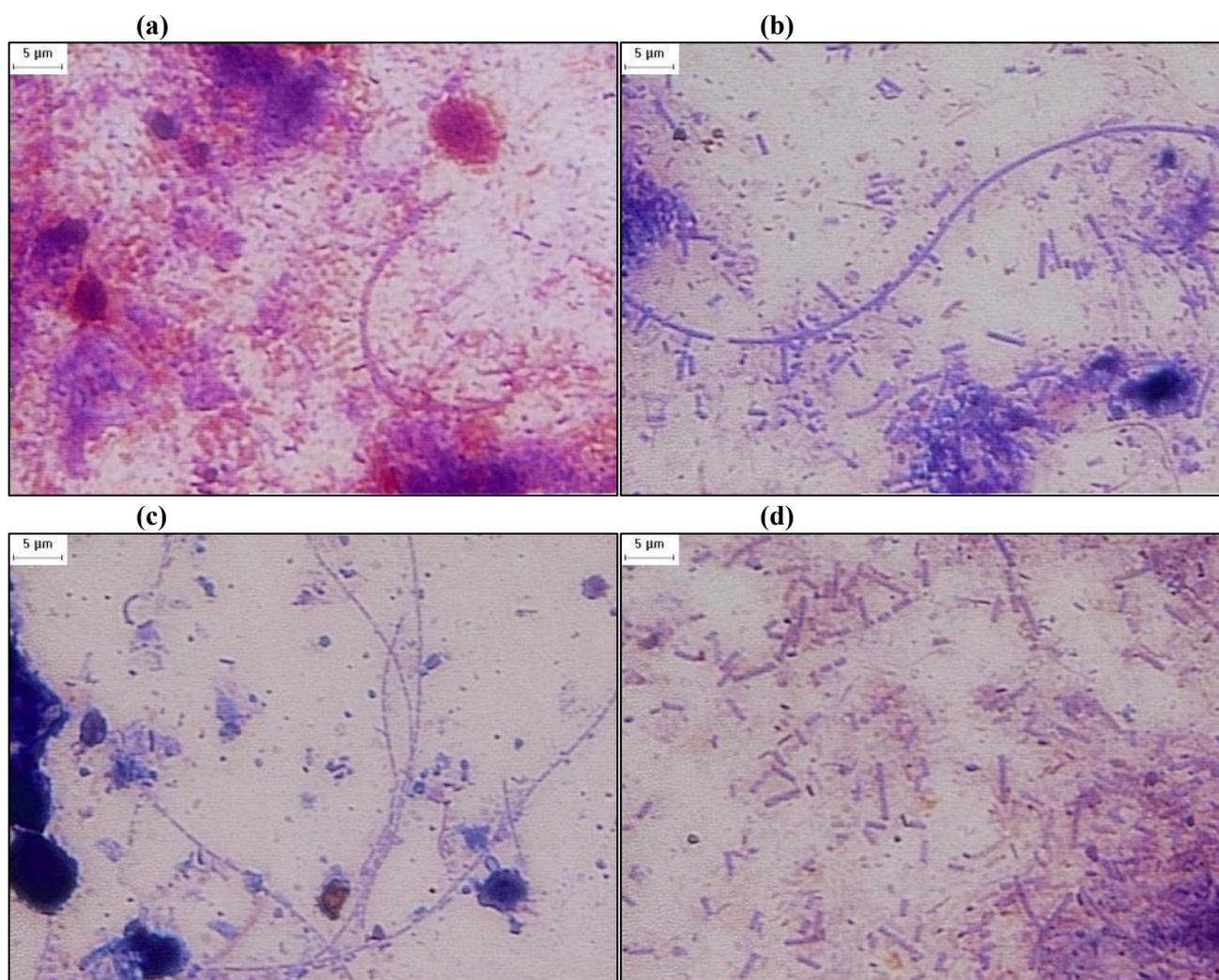
**Tabela 5.1.** Análises de sólidos dos inóculos.

<i>Parâmetro (g.l<sup>-1</sup>)</i>	<b>Inóculo</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Sólidos totais – ST	51,14	44,31	34,17	43,21
Sólidos totais fixos – STF	9,27	7,59	12,75	9,87
Sólidos totais voláteis - STV	41,87	36,72	21,42	33,34

Os sólidos voláteis representam uma estimativa da matéria orgânica presente nos sólidos, enquanto os sólidos fixos representam a matéria inorgânica ou mineral (SPERLING, 2005).

A caracterização morfológica dos inóculos feita por análises microscópicas em coloração de Gram mostrou a grande variedade bacteriológica presente nos inóculos (Figura 5.1). Foi possível observar que o inóculo 1 contém predomínio de bactérias Gram-negativas. Entretanto para os inóculos 2 e 3 foi observado predomínio de bactérias Gram-positivas. O inóculo 4, apresentou uma mistura do observado nos outros inóculos, ou seja, Gram-positivas e Gram-negativas, como era de se esperar por ser uma mistura dos três inóculos. Nos inóculos 1, 2 e 3 foram observadas morfologias de cocos e bacilos.

**Figura 5.1.** Microscopia de luz comum, com técnica de coloração de Gram, nos inóculos.



(a) Inóculo 1 - Lodo do tratamento de águas residuárias de avicultura, (b) Inóculo 2 - Lodo do tratamento de águas residuárias de avicultura, (c) Inóculo 3 - Lodo do tratamento de Esgoto Sanitário Municipal, (d) Inóculo 4 - Mistura dos lodos 1, 2 e 3 na mesma proporção.

Fonte: Próprio autor

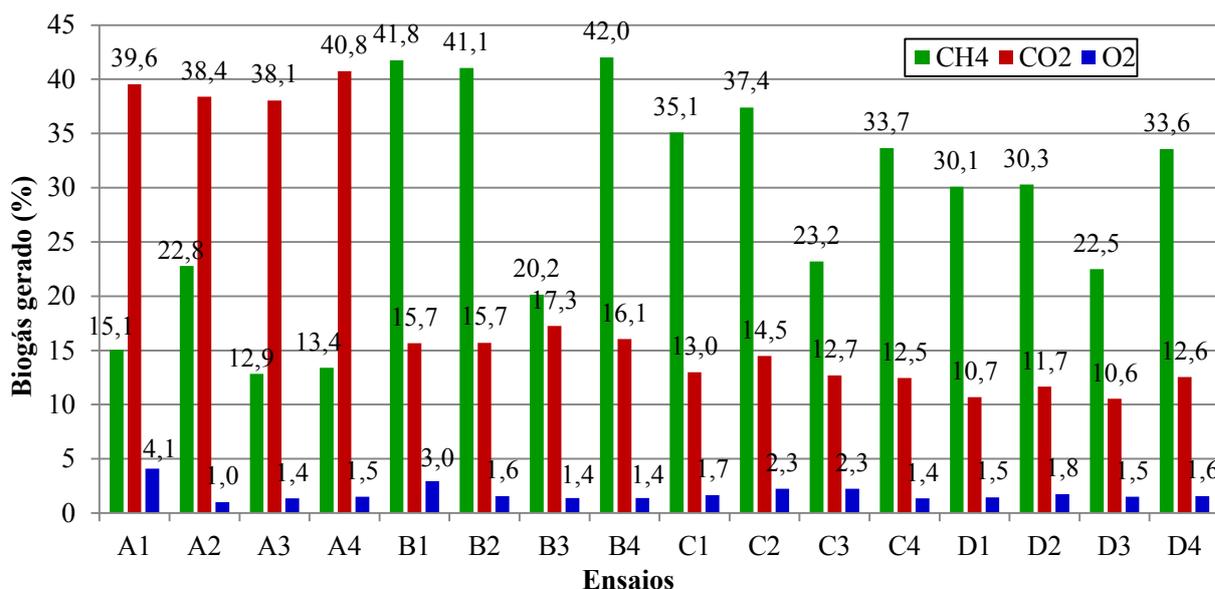
### 5.1.2. Testes de geração de biogás para os inóculos (1), (2), (3) e (4)

#### 5.1.2.1. Cultivo em meio PYG com tamponantes

Em todos os reatores anaeróbios (tabela 4.2) foi observado produção de biogás (Figura 5.2). Como o meio PYG é um meio complexo, na concentração A (10g de glicose.l<sup>-1</sup>) houve uma grande oferta de carbono a ser consumida, desta forma favoreceu a geração de CO<sub>2</sub> pela bactérias fermentativas, as gerações mais elevadas do gás carbônico foram observadas em proporções máximas de 40,8% para o inóculo 4 (Figura 5.2). Os melhores resultados foram obtidos para a condição B (2g de glicose.l<sup>-1</sup>). Os inóculos 1, 2 e 4 geraram metano em proporções, respectivamente, de 41,8%, 41,1% e 42,0%; valores praticamente equivalentes. Exceto o inóculo 3, que gerou a menor concentração, apenas 20,2% de gás

metano para a condição B. Nas condições B (2g de glicose.l<sup>-1</sup>), C (1g de glicose.l<sup>-1</sup>) e D (0,67g de glicose.l<sup>-1</sup>), as porcentagens de gás carbônico não chegaram aos 20%, pois, pela rota da digestão anaeróbia, quando há geração de metano, em média de 70 a 80% de gás, o gás carbônico é gerado em cerca de 20 a 30% (CHERNICHARO, 2007).

**Figura 5.2.** Biogás produzido no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com glicose.



Condições: A (10g.l<sup>-1</sup> glicose, 5g.l<sup>-1</sup> peptona, 5g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 5g.l<sup>-1</sup> extrato de carne); B (2g.l<sup>-1</sup> glicose, 1g.l<sup>-1</sup> peptona, 1g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 1g.l<sup>-1</sup> extrato de carne); C (1g.l<sup>-1</sup> glicose, 0,5g.l<sup>-1</sup> peptona, 0,5g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,5/L extrato de carne); D(0,67g.l<sup>-1</sup> glicose, 0,33g.l<sup>-1</sup> peptona, 0,33g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,33g.l<sup>-1</sup> extrato de carne.); para os inóculos 1, 2, 3 e 4.

Fonte: Próprio autor

Nas condições C (1g de glicose.l<sup>-1</sup>) e D (0,67g de glicose.l<sup>-1</sup>) os resultados foram próximos, obtendo-se proporções máximas de 37,4% de gás metano para a condição C2 (1g de glicose.l<sup>-1</sup> e inóculo 2). Proporções mais reduzidas de geração de metano foram de 22,5% para a condição D3 (0,67g de glicose.l<sup>-1</sup> e inóculo 3).

As porcentagens de oxigênio variaram de 1 a 4%; valores muito reduzidos que provavelmente não interferiram na digestão anaeróbia dos ensaios. Além disso, essas porcentagens podem ser advindas da canalização do próprio aparelho de medida do biogás que foi utilizado.

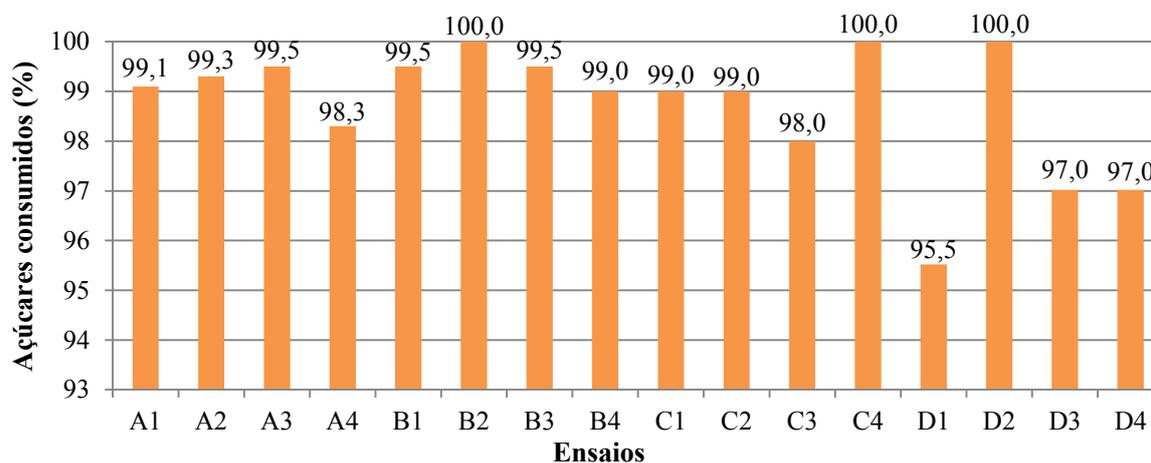
Avaliando a geração do gás metano, os inóculos 1, 2 e 4 apresentaram valores próximos na concentração B (2g de glicose.l<sup>-1</sup>). Enquanto que o inóculo 3 apresentou as menores gerações do biogás em comparação com os demais inóculos. Gerações mais elevadas de gás metano no *headspace* foram de 42% na condição B4 (2g de glicose.l<sup>-1</sup> e inóculo 4), e a menor de 12,9% no ensaio A3 (10g de glicose.l<sup>-1</sup> e inóculo 3).

Somando-se as porcentagens de biogás no *headspace* dos reatores anaeróbios vemos que os ensaios não atingiram 100%. Esse fato pode ser devido ao Nitrogênio (N<sub>2</sub>) representar mais da metade dos gases presentes em todos os reatores. Isto ocorre, pois o gás nitrogênio foi fluxionado no início do processo para garantir a anaerobiose e por ser inerte não foi consumido pelas bactérias.

As análises do consumo de açúcares mostraram que praticamente todo o açúcar foi consumido nos reatores anaeróbios (Figura 5.3), apresentando valores maiores que 95% de consumo. A condição D (0,67g de glicose.l<sup>-1</sup>) apresentou os menores valores de consumo, com 95,5% para o inóculo 1, e 97% para os inóculos 3 e 4, apenas o inóculo 2 consumiu 100% dos açúcares.

Como todos os reatores geraram gás metano (Figura 5.2), vemos que em todas as concentrações de glicose impostas (condições A, B, C e D – 10g, 2g, 1g e 0,67g de glicose.l<sup>-1</sup>) houve o consumo quase total dos açúcares. Açúcares são carboidratos facilmente solubilizados pelos microrganismos fermentativos, posteriormente, convertendo-se em ácidos por bactérias acidogênicas para a geração do biogás, em velocidade ideal à capacidade das arqueias metanogênicas.

**Figura 5.3.** Consumo de açúcares totais no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com glicose.



Condições: A (10g.l<sup>-1</sup> glicose, 5g.l<sup>-1</sup> peptona, 5g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 5g.l<sup>-1</sup> extrato de carne); B (2g.l<sup>-1</sup> glicose, 1g.l<sup>-1</sup> peptona, 1g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 1g.l<sup>-1</sup> extrato de carne); C (1g.l<sup>-1</sup> glicose, 0,5g.l<sup>-1</sup> peptona, 0,5g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,5/L extrato de carne); D(0,67g.l<sup>-1</sup> glicose, 0,33g.l<sup>-1</sup> peptona, 0,33g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,33g.l<sup>-1</sup> extrato de carne.); para os inóculos 1, 2, 3 e 4.

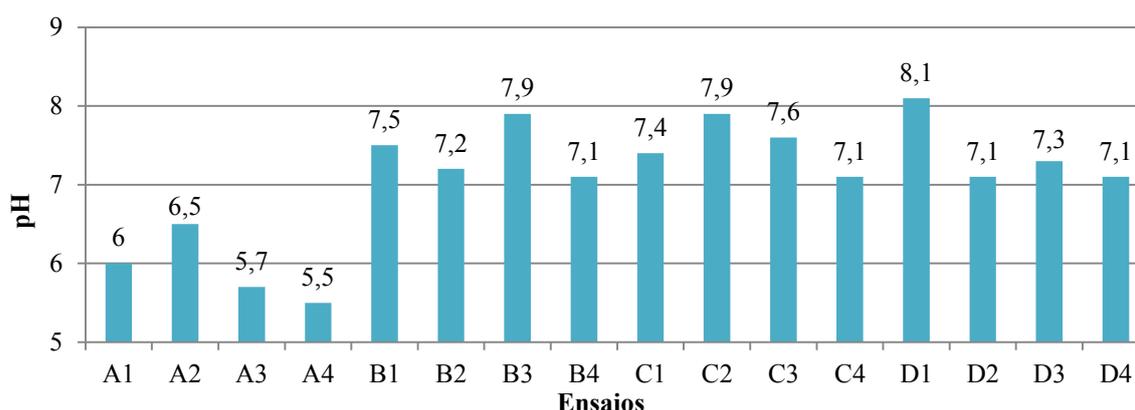
Fonte: Próprio autor

O pH final variou de 5,5 até 8,1 (Figura 5.4). Observou-se que pH mais reduzidos foram para condição A (10g glicose.l<sup>-1</sup>). Para concentrações mais elevadas de glicose aplicadas (condição A – 10g de glicose.l<sup>-1</sup>) pode ter ocorrido sobrecarga de matéria orgânica

inibindo ou reduzindo a capacidade das arqueias acetogênicas e metanogênicas. Outra possibilidade seria que com as concentrações mais elevadas de glicose ( $10 \text{ g.l}^{-1}$ ) geraram maiores quantidades de ácidos voláteis nas fases iniciais e tal fato pode ter provocado a queda do pH, acidificando o reator, inviabilizando o seu consumo uma vez que arqueias metanogênicas são sensíveis à variação do pH (ANDREOLI et al, 2001).

Segundo Andreoli et al (2001), o pH ótimo para a geração de gás metano é em torno de 7,0. Gerações mais elevadas de metano (Figura 5.2) foram verificadas nas condições B ( $2 \text{ g de glicose.l}^{-1}$ ) e C ( $1 \text{ g de glicose.l}^{-1}$ ), onde observou-se variações de pH 7,1 a 7,9. Os agentes tamponantes fosfato monopotássico e hidrogenofosfato de potássio foram adicionados visando manter o pH inicial de 7,0. Porém, pode-se observar pH finais não se mantiveram neutros, mostrando que os agentes tamponantes usados não foram totalmente eficazes (Figura 5.4). Para as próximas etapas outros tampões foram adicionados.

**Figura 5.4.** pH no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com glicose



Condições: A ( $10 \text{ g.l}^{-1}$  glicose,  $5 \text{ g.l}^{-1}$  peptona,  $5 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de levedura,  $5 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de carne); B ( $2 \text{ g.l}^{-1}$  glicose,  $1 \text{ g.l}^{-1}$  peptona,  $1 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de levedura,  $1 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de carne); C ( $1 \text{ g.l}^{-1}$  glicose,  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$  peptona,  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de levedura,  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de carne); D ( $0,67 \text{ g.l}^{-1}$  glicose,  $0,33 \text{ g.l}^{-1}$  peptona,  $0,33 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de levedura,  $0,33 \text{ g.l}^{-1}$  extrato de carne.); para os inóculos 1, 2, 3 e 4.

Fonte: Próprio autor

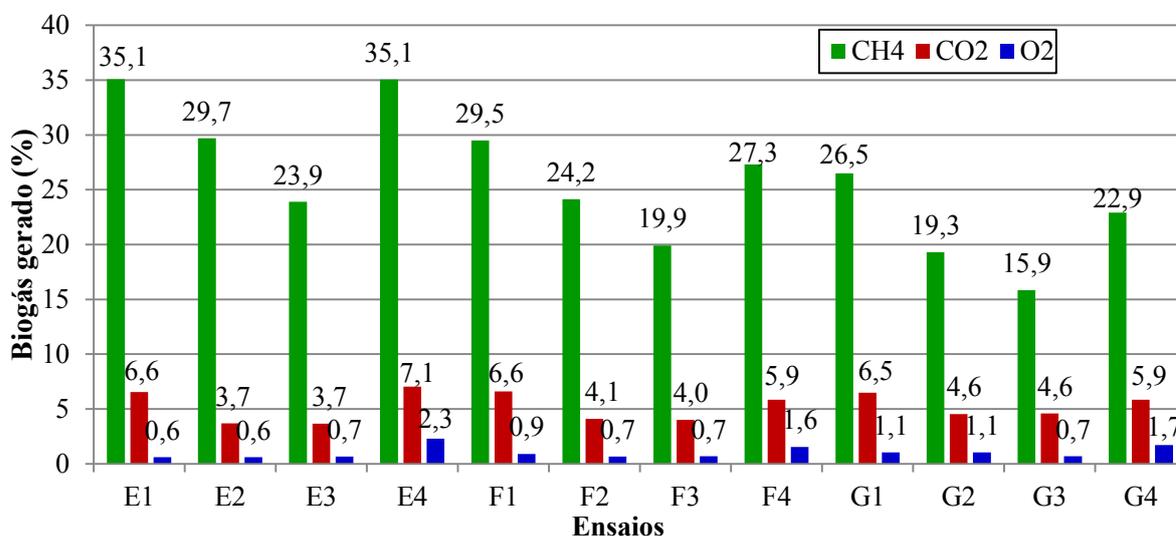
Correlacionando a análise de sólidos (Tabela 5.1) com a geração do biogás (Figura 5.2), observou-se que o inóculo 3 com concentrações mais reduzidas de sólidos também foi o que obteve os menores resultados de produção de metano para as condições B ( $2 \text{ g de glicose.l}^{-1}$ ), C ( $1 \text{ g de glicose.l}^{-1}$ ) e D ( $0,67 \text{ g de glicose.l}^{-1}$ ). O inóculo 1 que apresentou concentrações mais elevadas de sólidos, também apresentou a maior geração de gás metano, evidenciando que quanto maior a concentração de sólidos, maior a geração de biogás, provavelmente devido à maior quantidade de bactérias anaeróbias presentes nesse inóculo.

### 5.1.2.2. Cultivo em acetato de sódio com tamponantes

Ocorreu geração de biogás em todos os reatores anaeróbios. As proporções de metano foram superiores (Figura 5.5) quando comparados aos ensaios anteriores (Figura 5.2) em cultivo com glicose. Resultado esperado, pois, segundo Chernicharo (2007), na ausência de hidrogênio, a decomposição anaeróbia do ácido acético conduz à formação de metano e gás carbônico, conforme a equação 5.1.



**Figura 5.5.** Biogás produzido no final da operação dos anaeróbios alimentados com acetato de sódio



Condições: E (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>); F (1g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), e G (0,5g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), para os inóculos 1, 2, 3 e 4.

Fonte: Próprio autor

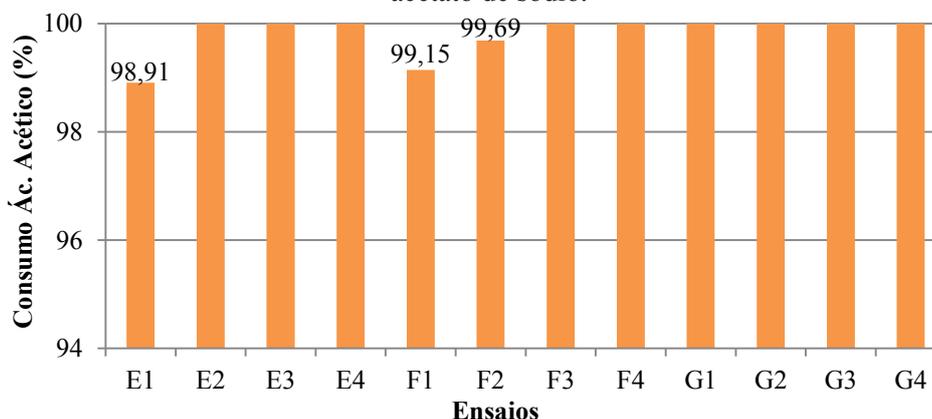
As arqueias metanogênicas produzem metano conforme a disponibilidade de substrato no meio, desta forma, dependem das bactérias formadoras de ácidos (CHERNICHARO, 2007). Nos reatores, como o ácido acético já foi fornecido, a produção do gás metano dependia da concentração desse substrato. Assim, como se observa na Figura 5.5, as porcentagens de gás metano foram proporcionais às concentrações de ácido fornecidas: ou seja, quanto mais ácido acético, maior o consumo pelas metanogênicas acetoclásticas e, maior a geração de metano. As maiores gerações de gás metano foram para as condições E1 (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup> e inóculo 1) e E4 (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup> e inóculo 4) com 35,1%. E a menor geração foi de 15,9% no ensaio G3 (0,5g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup> e inóculo 3).

Para os inóculos 1 e 4 foram obtidos os valores mais elevados de geração de gás metano. Entretanto, o inóculo 2 apresentou valores medianos, enquanto o inóculo 3, apresentou os menores valores em todas as concentrações testadas.

As concentrações de gás carbônico mantiveram-se baixas, com o máximo de 7,1% no ensaio E4 (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup> e inóculo 4), e mínima de 3,7% nos ensaios E2 (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup> e inóculo 2) e E3 (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup> e inóculo 3). Valores aceitáveis, pois o cultivo em acetato de sódio favorece a etapa metanogênica da digestão anaeróbia (Chernicharo, 2007). Desta forma, observou-se que metano (CH<sub>4</sub>) foi o principal produto gerado para os consumos de acetato de sódio, evidenciando a capacidade de degradação da matéria orgânica por arqueias metanogênicas acetoclásticas.

A análise do consumo de ácido acético mostrou que praticamente todo o acetato de sódio foi consumido nos reatores anaeróbios (Figura 5.6), apresentando valores maiores que 98% de consumo. Como todos os reatores geraram gás metano (Figura 5.5), vemos que em todas às concentrações de acetato de sódio impostas (condições E, F e G – 2g, 1g e 0,5g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>) houve o consumo praticamente total do ácido. Resultado esperado, pois, como já discutido anteriormente, as bactérias metanogênicas dependem do acetato para gerar o biogás, na ausência de hidrogênio.

**Figura 5.6.** Consumo de ácido acético no final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com acetato de sódio.



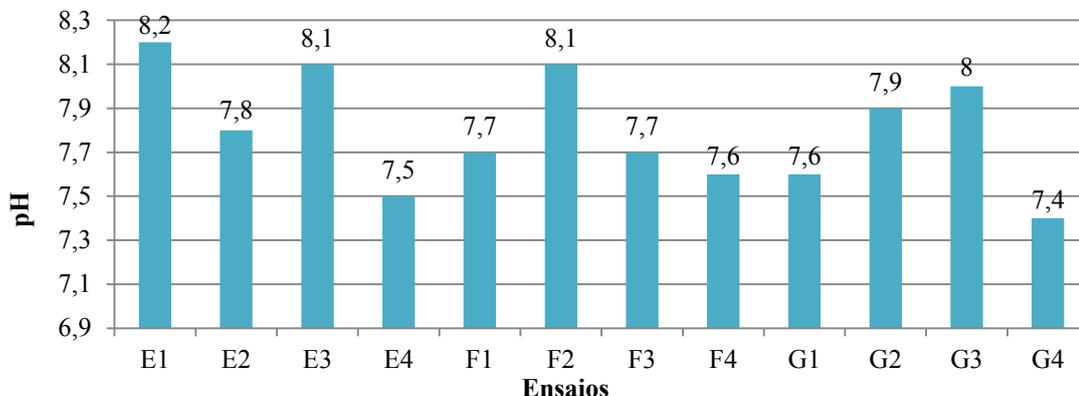
Condições: E (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>); F (1g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), e G (0,5g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), para os inóculos 1, 2, 3 e 4

Fonte: Próprio autor

Para os ensaios com cultivo em acetato de sódio o pH no final da operação não se manteve em 7,0 (Figura 5.7). O menor valor de pH foi 7,4 no ensaio G4, e o maior valor foi 8,2 no ensaio E1. A variação de pH durante os ensaios não teve grande influência na geração de biogás, mesmo com pH final de 8,0 os reatores geraram gás metano. Segundo Andreoli et al (2001), o pH ideal para a metanogênese pode ocorrer entre pH 6,0 a 8,0; valores obtidos no

presente estudo ao final da operação. Nesse caso, a adição dos agentes tamponantes foram eficientes para a manutenção do pH ideal para a metanogênese.

**Figura 5.7.** pH para no final da operação dos anaeróbios alimentados com acetato de sódio.



Condições: E (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>); F (1g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), e G (0,5g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), para os inóculos 1, 2, 3 e 4

Fonte: Próprio autor

Novamente, a produção de biogás foi diretamente proporcional à quantidade de sólidos totais voláteis (Tabela 5.1). Os melhores resultados na geração de metano foram encontrados no inóculo 1, que é o lodo que apresenta maior quantidade de STV (41,87 g.l<sup>-1</sup>). Enquanto o inóculo 3 apresenta os menores valores de STV (21,42 g.l<sup>-1</sup>) e menor geração de metano de 23,9%, 19,9% e 15,9%, respectivamente, para as condições E3 (2g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), F3 (1g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>), e G3 (0,5g de acetato de sódio.l<sup>-1</sup>).

Isto pode ser explicado, pois, de acordo com SPERLING (2005), os sólidos totais voláteis representam uma estimativa da matéria orgânica presente no composto. Portanto, quanto mais matéria orgânica, maior o substrato para a ação dos microrganismos da digestão anaeróbia.

### 5.1.2. Seleção da fonte de inóculo

Os inóculos 1, 2 e 4 apresentaram resultados semelhantes na geração de gás metano. Todos os três tiveram porcentagens elevadas de metano no *headspace* e nas concentrações de sólidos. Portanto, pela proximidade dos resultados, qualquer um dos três inóculos foi satisfatório para a geração de biogás. Desta forma, o inóculo escolhido foi o inóculo 2, um lodo granular mesofílico do tratamento de águas residuárias de avicultura, localizado em Pereiras – SP, proveniente de reator UASB (do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), conforme descrito anteriormente.

## 5.2. Resíduo industrial

### 5.2.1. Caracterização do resíduo industrial

Visualmente, o resíduo apresentou coloração amarelada (Figura 5.8), e algumas partículas em suspensão.

**Figura 5.8.** Aparência o resíduo da indústria de desinfestantes ambientais.



Fonte: Próprio autor

O teste de DQO fornece uma indicação da quantidade de matéria orgânica carbonácea (NUVOLARI, 2003). De acordo com Sperling (2005), a matéria orgânica carbonácea, com base no carbono orgânico, é composta pela fração degradável e biodegradável. Segundo Nuvolari (2003), a legislação brasileira não fixa valores baseados no teste de DQO. Portanto, para efeito de comparação, Foresti (2013) afirma que a faixa de valores de DQO característica de esgotos sanitários é em torno de 0,25 a 0,8 g.l<sup>-1</sup>. Pires, Zamariolli e del Nery (2013) apresentam características de águas residuárias industriais predominantemente orgânicas e, as águas da indústria sucroalcooleira apresentam valores de pH reduzidos, entre 3,5 e 5, e de DQO elevados, com mais de 30g.l<sup>-1</sup> até 150 g.l<sup>-1</sup>, conforme verificado no presente estudo (Tabela 5.2).

Valores de pH afastados da neutralidade podem afetar os microrganismos e a vida aquática em geral (SPERLING, 2005). A resolução CONAMA 357/2005 determina que o padrão de lançamento de efluentes, direto ou indireto, em corpos d'água deve ser com pH entre 5,0 e 9,0. Nesse caso, esse tipo de efluente teria que ser alcalinizado previamente para ser lançado no ambiente.

**Tabela 5.2.** Caracterização do resíduo industrial usado nos ensaios de geração de biogás

pH	Absorbância (nm)	DQO (g.l <sup>-1</sup> )	Açúcares totais (g.l <sup>-1</sup> )	Sólidos Totais (g.l <sup>-1</sup> )	Sólidos Fixos Totais (g.l <sup>-1</sup> )	Sólidos Voláteis Totais (g.l <sup>-1</sup> )
3,19	0,610	73,5	26	3,74	0,22	3,52

Fonte: Próprio autor

A concentração de sólidos totais foi reduzida ( $3,74\text{g.l}^{-1}$ ), se levarmos em consideração os sólidos dos inóculos testados (Tabela 5.1). Entretanto, as concentrações de sólidos fixos e sólidos voláteis indicam que há mais matéria orgânica no resíduo,  $3,52\text{ g.l}^{-1}$  de sólidos voláteis, do que material mineral,  $0,22\text{ g.l}^{-1}$  de sólidos fixos.

### 5.2.2. Reativação e purificação celular

Foi verificado crescimento microbiano tanto na reativação do resíduo em meio de cultivo quanto nas diluições seriadas. Na Figura 5.9 foi observado turbidez em todos os reatores da diluição seriada, indicando o crescimento bacteriano (Tabela 5.3). O reator anaeróbio de maior diluição ( $10^{-7}$ ) apresentou turbidez de  $1,322\text{ nm}$ , sendo obtida a cultura bacteriana purificada.

**Tabela 5.3.** Crescimento celular nos reatores anaeróbios de diluição seriada.

Diluição	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
Turbidez (nm)	0,740	1,331	1,295	1,388	1,447	1,303	1,322

Fonte: Próprio autor

**Figura 5.9.** Reatores anaeróbios de diluição seriada para purificação do resíduo industrial



Fonte: Próprio autor

### 5.2.3. Caracterização nutricional

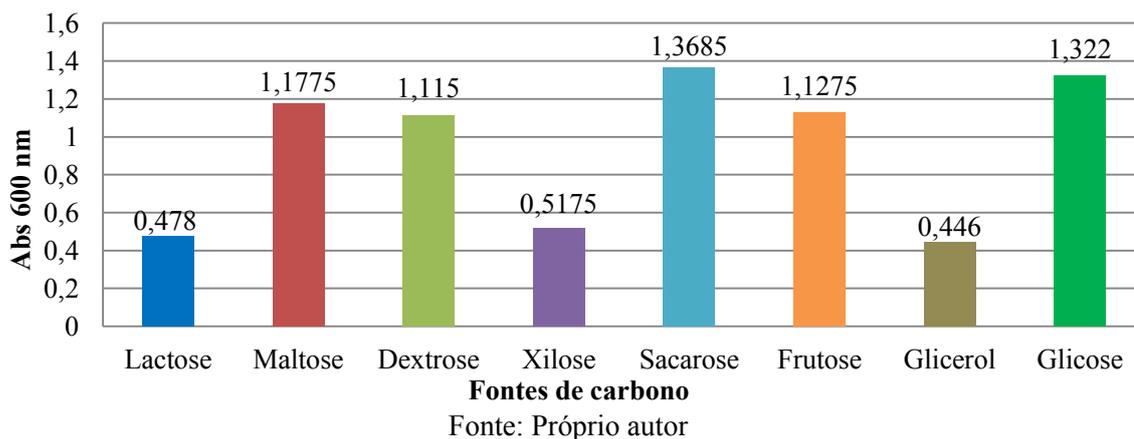
A avaliação nutricional da cultura purificada (diluição  $10^{-7}$ ) cresceu em todas as diferentes fontes de carbono (Figura 5.10). Maintinguer et al (2015), Song et al (2012) e Noparat et al (2011) também obtiveram crescimento bacteriano para bactérias isoladas produtoras de gás hidrogênio nas fontes de carbono testadas.

Observou-se maior crescimento nos meios de cultivo com sacarose e glicose. Da mesma forma, Song et al (2012) verificaram crescimentos mais elevados em sacarose, frutose, glicose e amido. Os crescimentos mais reduzidos foram observados para lactose e glicerol. Contrariamente, Nomura et al (2013), não observou crescimento em glicerol das bactérias

hidrogenotróficas. Já Maintinguer et al (2015) apresentaram crescimentos elevados das bactérias isoladas geradoras de H<sub>2</sub> em maltose e em glicerol.

Em comparação com o glicerol (0,446 nm) o crescimento celular em glicose (1,322 nm) foi 277% maior.

**Figura 5.10.** Crescimento celular das culturas isoladas (diluição 10<sup>-7</sup>) em reatores anaeróbios para diferentes fontes de carbono.



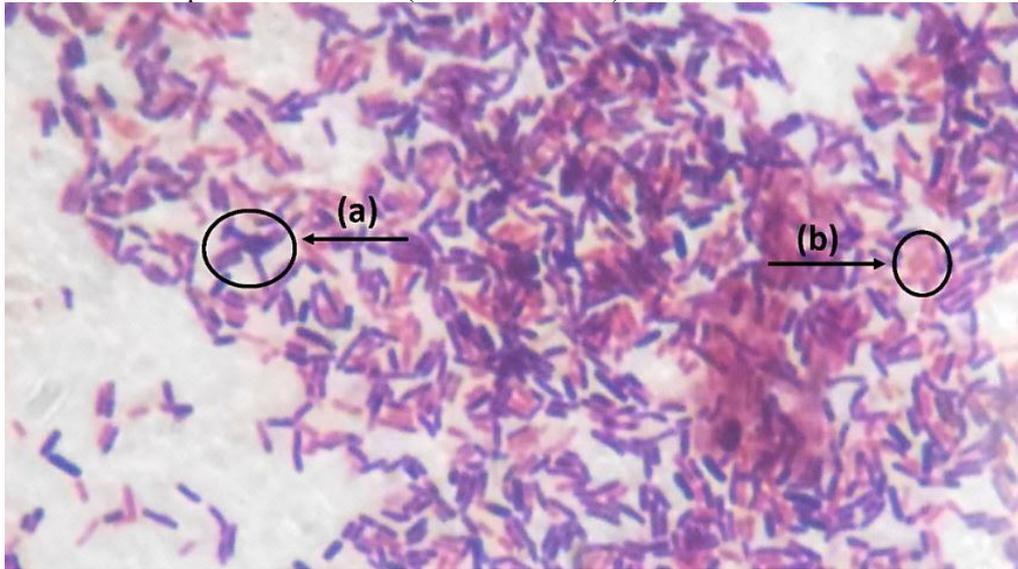
#### 5.2.4. Caracterização morfológica

Por meio da técnica de coloração de Gram, foi possível diferenciar células Gram positivas coradas em azul-violeta e células Gram negativas coradas em rosa. As análises microscópicas de coloração de Gram realizadas no resíduo reativado mostraram que o resíduo era composto principalmente por bacilos Gram positivos e Gram negativos (Figura 5.11). Além disso, a microscopia por contraste de fase demonstrou que as morfologias predominantes foram de bacilos, com presença rara de alguns cocos (Figura 5.12).

Nos testes realizados com o resíduo purificado (diluição 10<sup>-7</sup>) foi verificado predomínio de bacilos Gram positivos (Figura 5.13, Figura 5.14). Bactérias isoladas produtoras de hidrogênio podem apresentar morfologia em forma de bastonetes e coloração Gram positiva (NOMURA et al, 2013; SONG et al, 2012; NOPARAT et al, 2011), além de sobreviverem em pH ácido e próximos a 4,0 (MAINTINGUER et al, 2008).

A diversidade morfológica reduzida pode ser justificada devido ao pH 3,2 que, provavelmente, favoreceu a permanência de bacilos acidófilos.

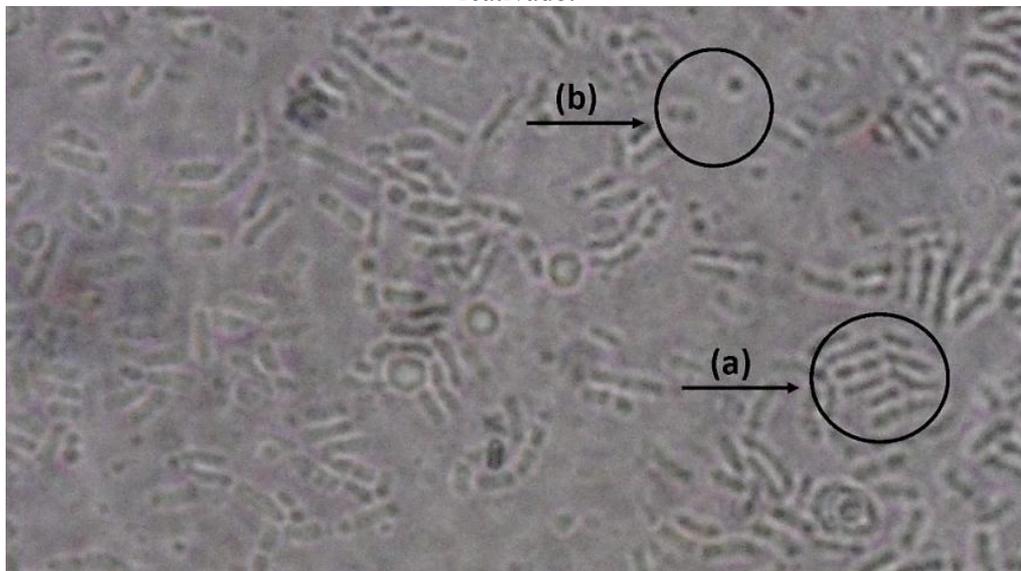
**Figura 5.11.** Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) em meio de cultivo do resíduo reativado.



(a) bacilos Gram positivos; (b) bacilos Gram negativos.

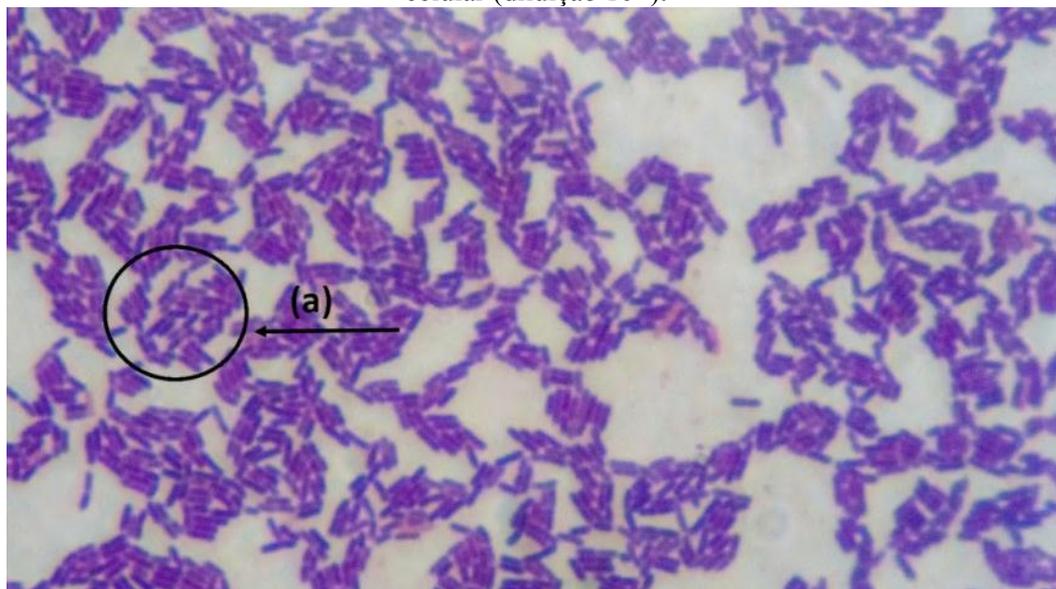
Fonte: Próprio autor

**Figura 5.12.** Microscopia de contraste de fase (aumento 1000 X) em meio de cultivo do resíduo reativado.



(a) bacilos; (b) cocos  
Fonte: Próprio autor

**Figura 5.13.** Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) em meio de cultivo após purificação celular (diluição  $10^{-7}$ ).



(a) bacilos Gram positivos.  
Fonte: Próprio autor

**Figura 5.14.** Microscopia de contraste de fase (aumento 1000 X) em meio de cultivo após purificação celular (diluição  $10^{-7}$ ).



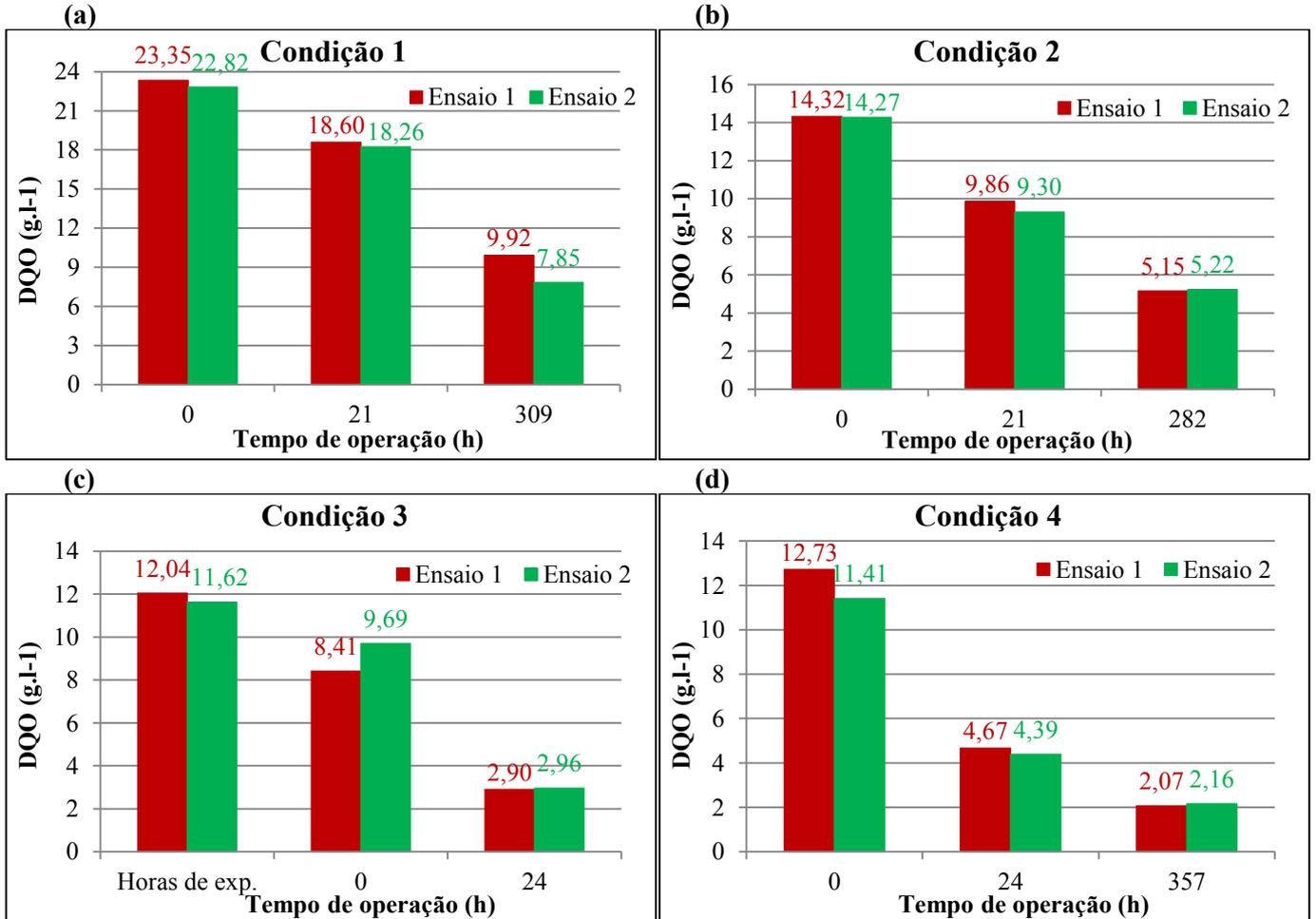
(a) bacilos.  
Fonte: Próprio autor

### 5.3. Ensaio de geração de biogás em reatores anaeróbios em batelada

#### 5.3.1. Consumo do substrato orgânico

Foi observado que em todos os reatores houve o consumo de DQO (Figura 5.15).

Figura 5.15. Variação temporal da DQO nos reatores anaeróbios.



(a) Condição 1 (100% meio de cultivo); (b) Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial); (c) Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial); (d) Condição 4 (100% resíduo industrial).

Ensaio 1: Sem filtro de NaOH. Ensaio 2: Com filtro de NaOH

Fonte: Próprio autor

Na biodigestão completa a DQO é consumida, principalmente, quando o gás metano e o dióxido de carbono são formados (LAMAISON et al, 2009).

Na condição 4 (100% resíduo industrial), para o ensaio de gás metano, houve 81,59% de consumo de DQO; o maior consumo dentre todos os ensaios realizados. As condições 2 e 3 apresentaram consumo de 64% e 74%, respectivamente. Enquanto que a condição 1 (100% meio de cultivo) no reator de geração de biogás teve o menor consumo, apenas 57,52%. Nessa condição 1 havia mais disponibilidade de fonte de carbono proveniente do meio de cultivo, fornecendo mais substrato para as bactérias fermentativas. Como já foi

discutido anteriormente, com o excesso de matéria orgânica, mais ácido pode ser produzido, inviabilizando assim a capacidade desse consumo por arqueias acetogênicas e metanogênicas. Segundo Chernicharo (2007), a remoção de DQO da fase líquida depende da conversão de acetato em metano. Na condição 4 (100% resíduo industrial) as arqueias metanogênicas foram capazes de consumir o acetato produzido, consumindo a DQO e gerando gás metano.

Segundo Chernicharo (2007), em sistemas anaeróbios por volta de 50 a 70% do material orgânico biodegradável é convertido em gás metano, porém, ao final da operação, ainda restam cerca de 10 a 30% de DQO afluyente, isto porque uma parcela da DQO é recalcitrante, ou seja, não pode ser degradada pelas bactérias fermentativas. Nos ensaios, as condições 3 e 4 atingiram essa meta, restando cerca de 25% de DQO na condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial), e 19% de DQO na condição 4 (100% resíduo industrial).

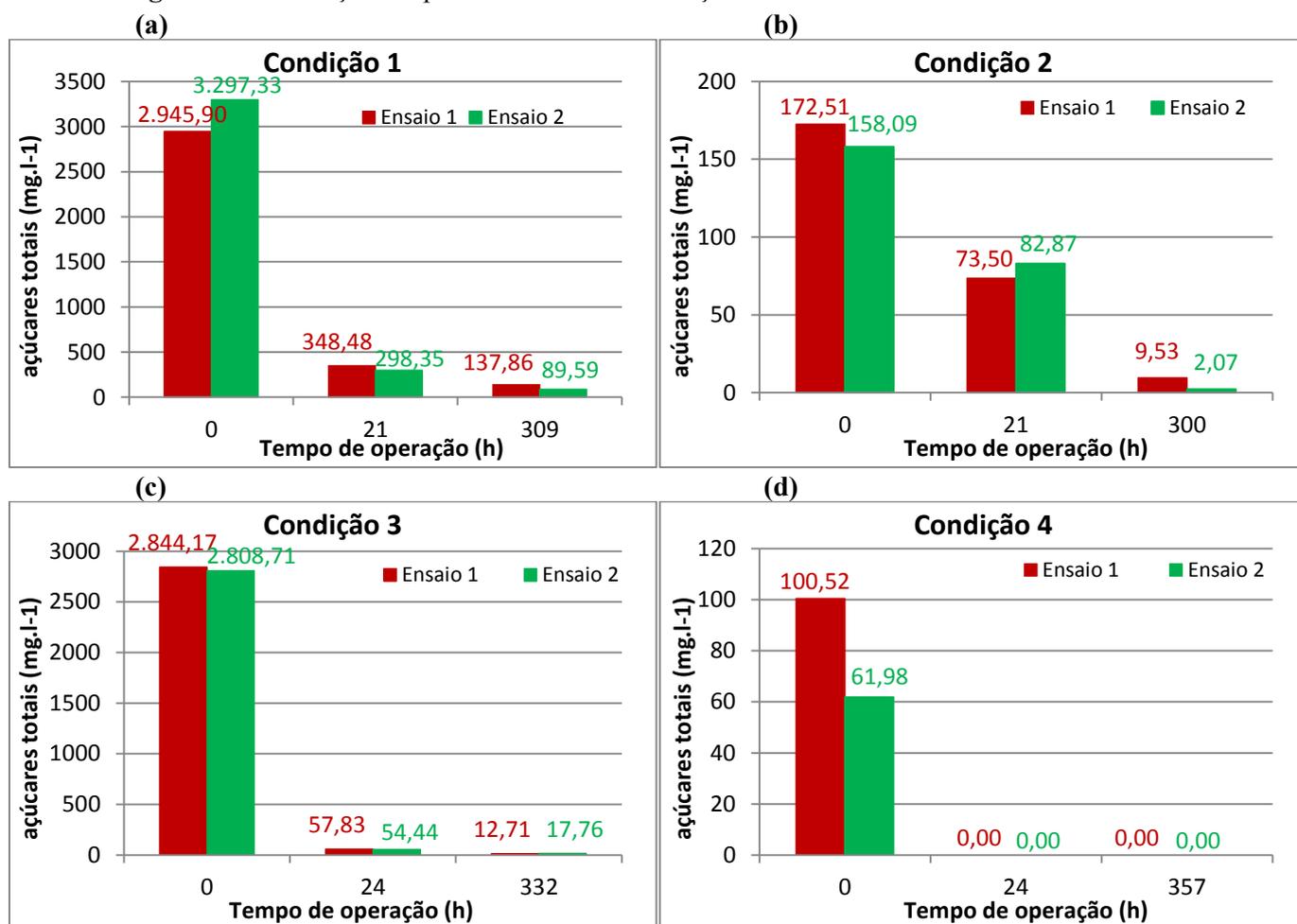
### *5.3.2. Consumo de açúcares totais*

Em todos os ensaios houve o consumo quase total dos açúcares. A taxa de consumo ultrapassou os 90% em todas as condições (Figura 5.16). Em 24 horas de operação, os açúcares já haviam sido consumidos, comprovando a ocorrência da fase fermentativa nos reatores. Na acidogênese, os microrganismos acidogênicos fermentam açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, e produzem ácidos orgânicos, álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio, que servirão de substrato para a produção do acetato pelos microrganismos acetogênicos (CHERNICHARO, 2007).

Apenas nos reatores da condição 4 (100% de meio de cultivo), o açúcar foi totalmente consumido em 24 horas de experimento. Esse fato pode ser devido à baixa concentração inicial de açúcar, cerca de  $75 \text{ mg.l}^{-1}$ , que foi consumido por bactérias fermentativas. Nos demais ensaios, a concentração de açúcar não chegou à zero ao final dos experimentos, mas na condição 3, ambos os reatores consumiram mais de 99% das concentrações iniciais de açúcares.

As menores taxas de consumo de açúcares foram nos ensaios de biogás das condições 1 (100% meio de cultivo) e 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial), com 95,32% e 94,47%, respectivamente. Provavelmente, concentrações mais elevadas de açúcares no início do experimento estavam além da capacidade de consumo dos microrganismos acidogênicos.

**Figura 5.16.** Variação temporal dos consumos de açúcares totais nos reatores anaeróbios



(a) Condição 1 (100% meio de cultivo); (b) Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial); (c) Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial); (d) Condição 4 (100% resíduo industrial).  
Ensaio 1: Sem filtro de NaOH. Ensaio 2: Com filtro de NaOH

Fonte: Próprio autor

### 5.3.3. Quantificação do biogás gerado

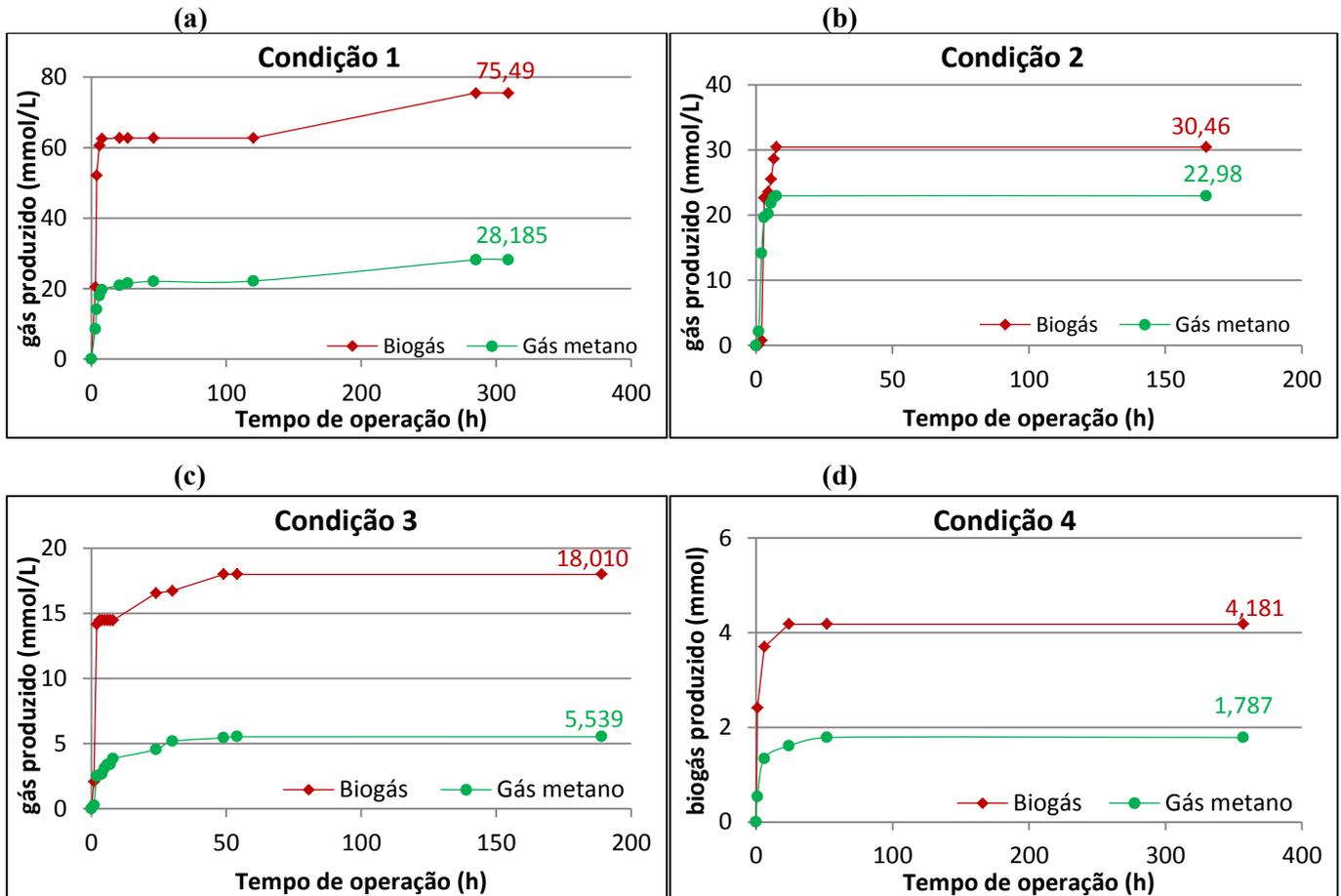
Em todos os ensaios houve geração de biogás (Figura 5.17).

A geração de gás metano é evidenciada, pois o CO<sub>2</sub>, também produto da biodigestão e/ou fermentação de carboidratos, fica retido no NaOH na forma de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (LAMAISON et al, 2009). Além disso, tal evidência foi comprovada com o uso do equipamento LANDTEC GEM 2000<sup>®</sup> ao final de cada ensaio, onde as porcentagens dos gases metano, gás carbônico e oxigênio foram detectadas.

Os ensaios produziram gás proporcionalmente com a quantidade de meio de cultivo PYG fornecida. Assim, para a condição 1 (100% meio de cultivo) foram obtidas gerações mais elevadas de gás metano com cerca de 28,185 mmols produzidos, enquanto que para a condição 4 (100% resíduo industrial) obteve-se apenas 1,787 mols de gás metano. Isto

ocorreu, provavelmente, devido à quantidade de fonte de carbono oferecida. Com adições mais elevadas de carbono, mais subprodutos foram gerados nas primeiras fases da digestão, fornecendo mais substrato para a geração do biogás.

**Figura 5.17.** Variação temporal da produção de biogás e gás metano nos reatores anaeróbios.



(a) Condição 1 (100% meio de cultivo); (b) Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial); (c) Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial); (d) Condição 4 (100% resíduo industrial).

Ensaio 1: Sem filtro de NaOH. Ensaio 2: Com filtro de NaOH

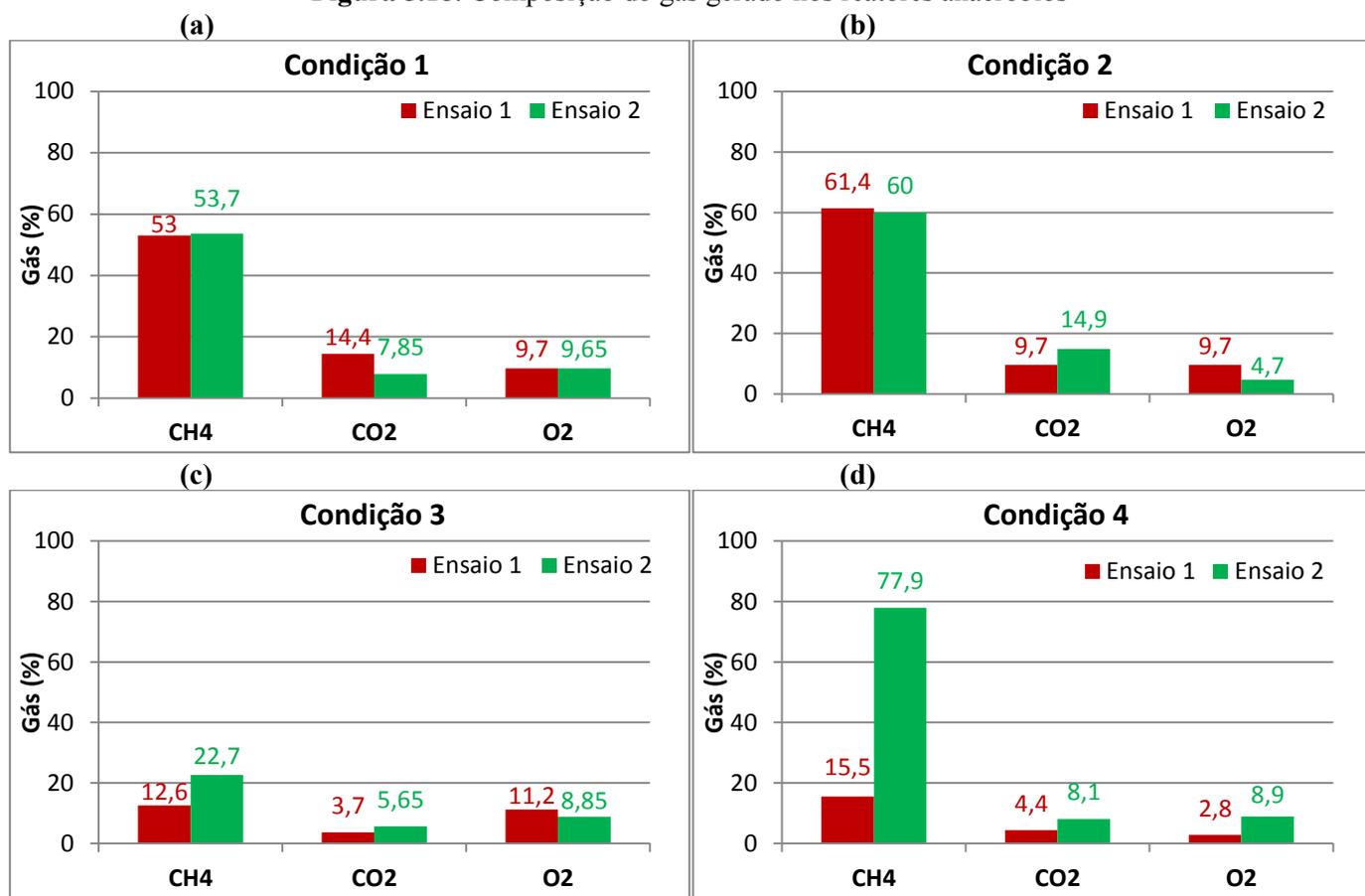
Fonte: Próprio autor

### 5.3.4. Composição do biogás gerado

Na Figura 5.18 observa-se a composição dos gases gerados no *headspace* dos reatores, medida antes da lavagem no filtro de NaOH.

Segundo Chernicharo (2007), a proporção de gás carbônico em relação ao gás metano pode variar dependendo das características do composto a ser degradado; para esgotos domésticos a proporção típica é em torno de 70 a 80% de CH<sub>4</sub> e 20 a 30% de CO<sub>2</sub>. A condição 4 (100% resíduo industrial), para o ensaio de gás metano, foi a que mais se aproximou deste índice, atingindo 77,9% de gás metano e 8,1% de gás carbônico.

**Figura 5.18.** Composição do gás gerado nos reatores anaeróbios



(a) Condição 1 (100% meio de cultivo); (b) Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial); (c) Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial); (d) Condição 4 (100% resíduo industrial).

Ensaio 1: Sem filtro de NaOH. Ensaio 2: Com filtro de NaOH

Fonte: Próprio autor

A condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial) obteve os menores valores de gás metano, com 12,6% para o ensaio 1 e 22,7% para o ensaio 2. Enquanto as condições 1 e 2 obtiveram resultados próximos, com cerca de 53% de metano na condição 1 (100% meio de cultivo), e 60% de metano na condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial).

As porcentagens de O<sub>2</sub> observadas não foram necessariamente gerados no processo biológico no interior dos reatores. Como era um sistema aberto, durante a quantificação do biogás, provavelmente, o aparelho onde foram realizadas as porcentagens do biogás gerado aspirou o *headspace* do reator, aspirando também o ar através da mangueira do sistema que não estava em condições anaeróbias. Além disso as porcentagens verificadas de O<sub>2</sub> foram de cerca de 10%, e portanto muito reduzidas, não interferindo na digestão anaeróbia. Desta forma, comprovou-se que o gás gerado nos reatores, que atravessou o filtro de NaOH era metano, e o biogás que ficou retido era CO<sub>2</sub>.

### 5.3.5. pH

O pH se manteve neutro ao final dos ensaios comprovando que os agentes tamponantes carbonato de cálcio, fosfato monopotássico e hidrogenofosfato de potássio foram eficazes (Tabela 5.4).

Quando as condições ambientais do sistema são favoráveis e as populações de arqueias acetogênicas e metanogênicas se encontram em quantidades suficientes, os ácidos são rapidamente consumidos e não se acumulam além da capacidade neutralizante do meio, como resultado, o pH permanece numa faixa favorável (CHERNICHARO, 2007). Deste modo, pode-se observar que as condições dos reatores foram favoráveis em todos os ensaios, com o auxílio dos agentes tamponantes.

**Tabela 5.4.** pH no final na operação dos reatores anaeróbios.

pH	Condição 1		Condição 2		Condição 3		Condição 4	
	Ensaio 1	Ensaio 2						
Inicial	7,51	7,5	6,99	7,06	6,99	7,10	7,02	7,08
Final	7,42	7,24	7,36	7,28	7,68	7,70	7,34	7,31

(a) Condição 1 (100% meio de cultivo); (b) Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial); (c) Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial); (d) Condição 4 (100% resíduo industrial).

Ensaio 1: Sem filtro de NaOH. Ensaio 2: Com filtro de NaOH

Fonte: Próprio autor

### 5.3.6. Análises de sólidos

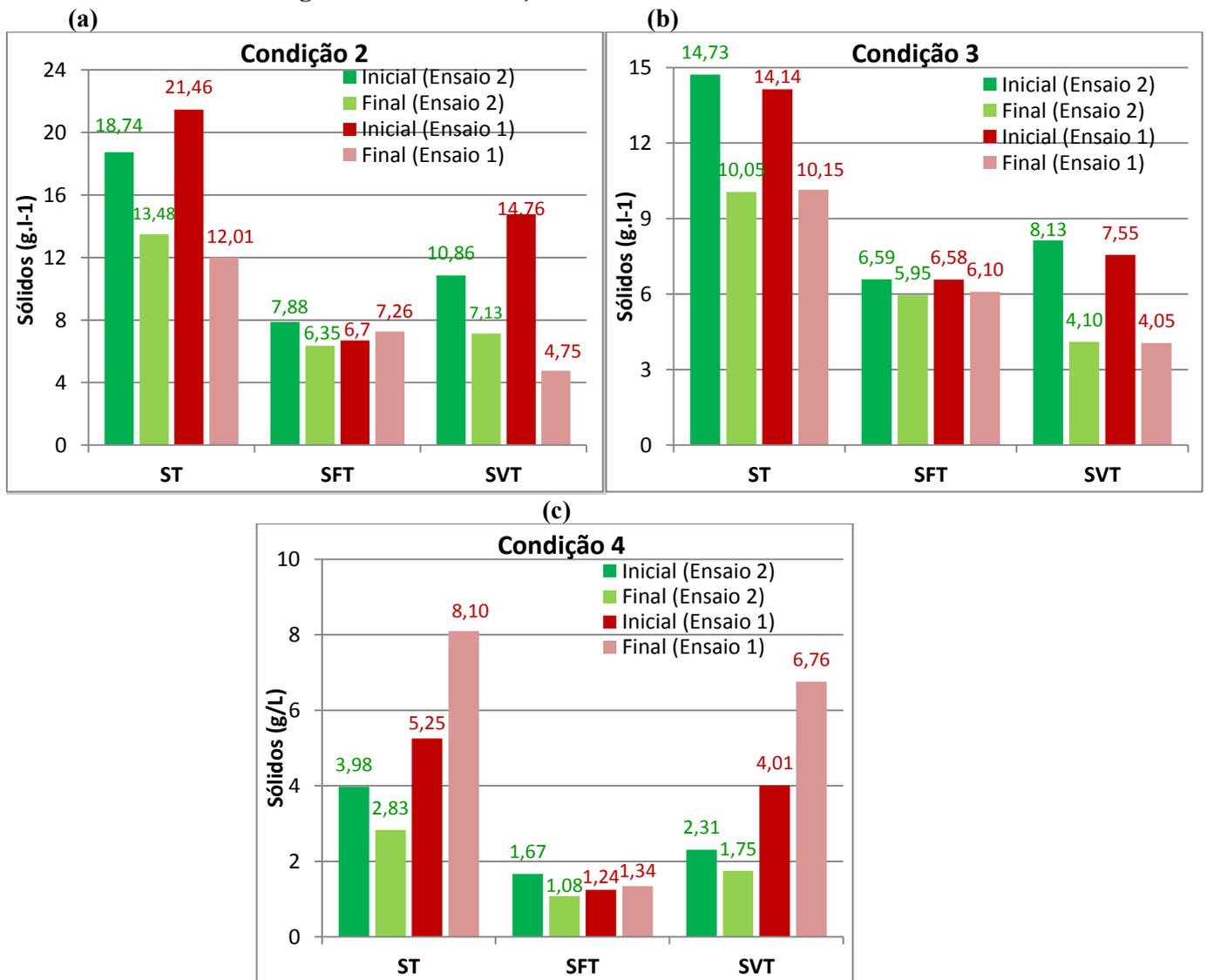
As análises de sólidos dos reatores mostraram que, em sua maioria, foram consumidos no final da operação dos reatores anaeróbios (Figura 5.19). Contrariamente, para a condição 4 (100% resíduo industrial), no ensaio “biogás”, houve elevação nas concentrações dos sólidos totais, ao invés de consumo. Isto pode ser explicado, pois, observou-se que o aumento foi na concentração dos sólidos voláteis, indicando, que pode ser devido ao crescimento da população bacteriana do reator. Possivelmente, as concentrações de matéria orgânica presentes mais reduzidas que nos demais ensaios, favoreceram os microrganismos em condições ideais para o seu crescimento.

As concentrações iniciais de sólidos mais elevadas foram na condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial), 18,74 e 21,46 g.l<sup>-1</sup>, devido ao meio de cultivo inserido que continha matéria orgânica e inorgânica a ser consumida pelos microrganismos. Nas condições 2 e 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial), e no ensaio “metano” da condição 4 (100% resíduo industrial), os sólidos totais foram consumidos ao final do

experimento, resultado esperado visto que, com a geração de metano a matéria orgânica é consumida pelos microrganismos, como já explicado anteriormente.

Como o resíduo possuía concentrações mais reduzidas de sólidos (Tabela 5.2), conseqüentemente, para a condição 4 (100% resíduo industrial) foram verificadas concentrações iniciais mais reduzidas de sólidos; como era de se esperar.

**Figura 5.19.** Concentração de sólidos nos reatores anaeróbios.



(a) Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial);  
 (b) Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial); (c) Condição 4 (100% resíduo industrial).

Ensaio 1: Sem filtro de NaOH. Ensaio 2: Com filtro de NaOH

Fonte: Próprio autor

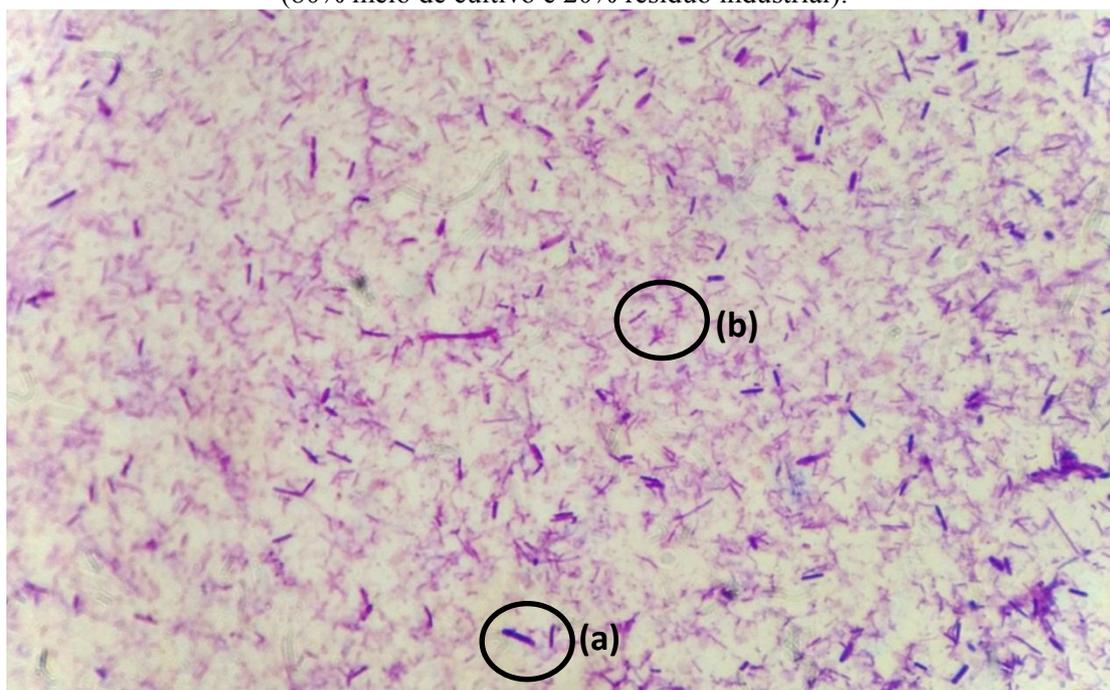
### 5.3.5. Análises microscópicas

As análises microscópicas com coloração de Gram mostraram a manutenção dos bacilos acidófilos presentes no resíduo industrial (Figuras 5.20, 5.21 e 5.22).

Os reatores da condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial), apresentaram bacilos Gram positivos e Gram negativos (Figura 5.20). Na condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial) a morfologia bacteriana predominante foram os bacilos Gram positivos, alguns deles com formação de endósporos terminais (Figura 5.21). Tais morfologias são características de espécies de bactérias produtoras de gás hidrogênio (MAINTINGUER et al 2008 e 2015). Entretanto, não foram realizadas análises de Biologia Molecular para a identificação de tais microrganismos. Provavelmente tais microrganismos estiveram envolvidos na fase fermentativa da digestão anaeróbia.

Apenas na condição 4 (100% resíduo industrial) foram identificadas bactérias filamentosas Gram negativas, mas também houve bacilos Gram positivos e negativos (Figura 5.22.). As arqueias metanogênicas do gênero *Methanosaeta* formam filamentos longos e finos (PATEL e SPROTT, 1990; CHAUHAN, OGRAM e REDDY, 2004; CHERNICHARO, 2007; NARAYANAN et al, 2009; MORI et al, 2012) e são predominantemente Gram negativas (PATEL e SPROTT, 1990; MORI et al, 2012). Provavelmente tais morfologias pertenciam à arqueias metanogênicas.

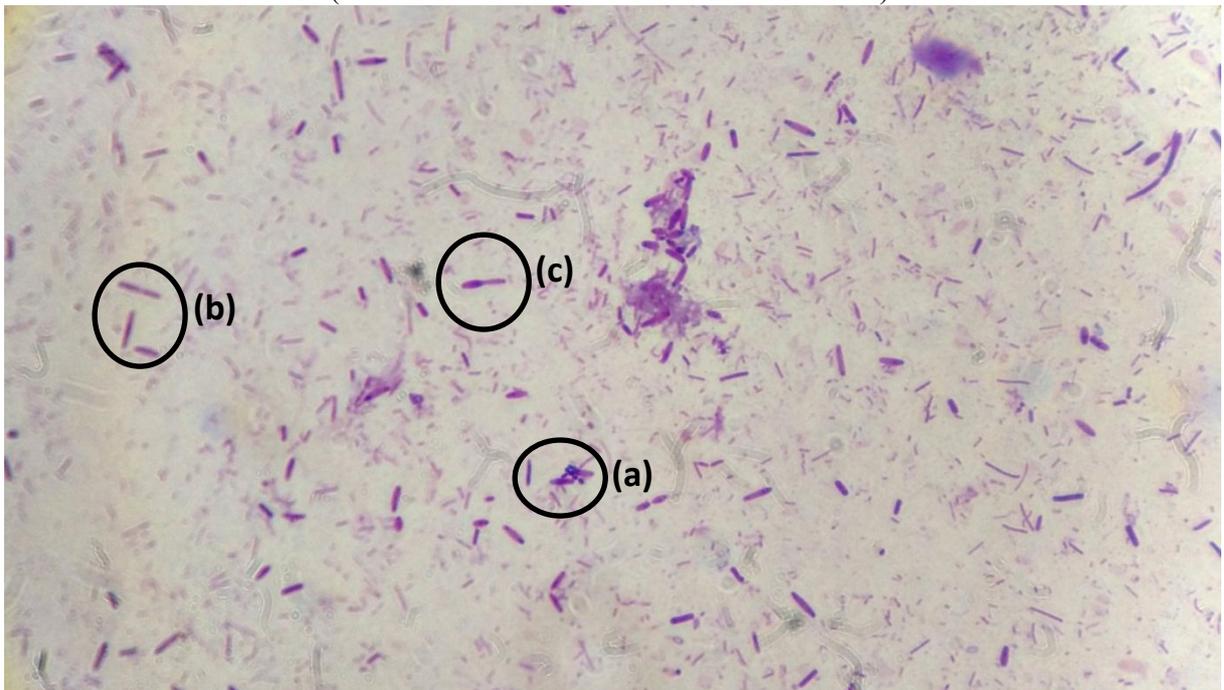
**Figura 5.20.** Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) dos reatores anaeróbios da Condição 2 (80% meio de cultivo e 20% resíduo industrial).



(a) bacilos Gram positivos; (b) bacilos Gram negativos.

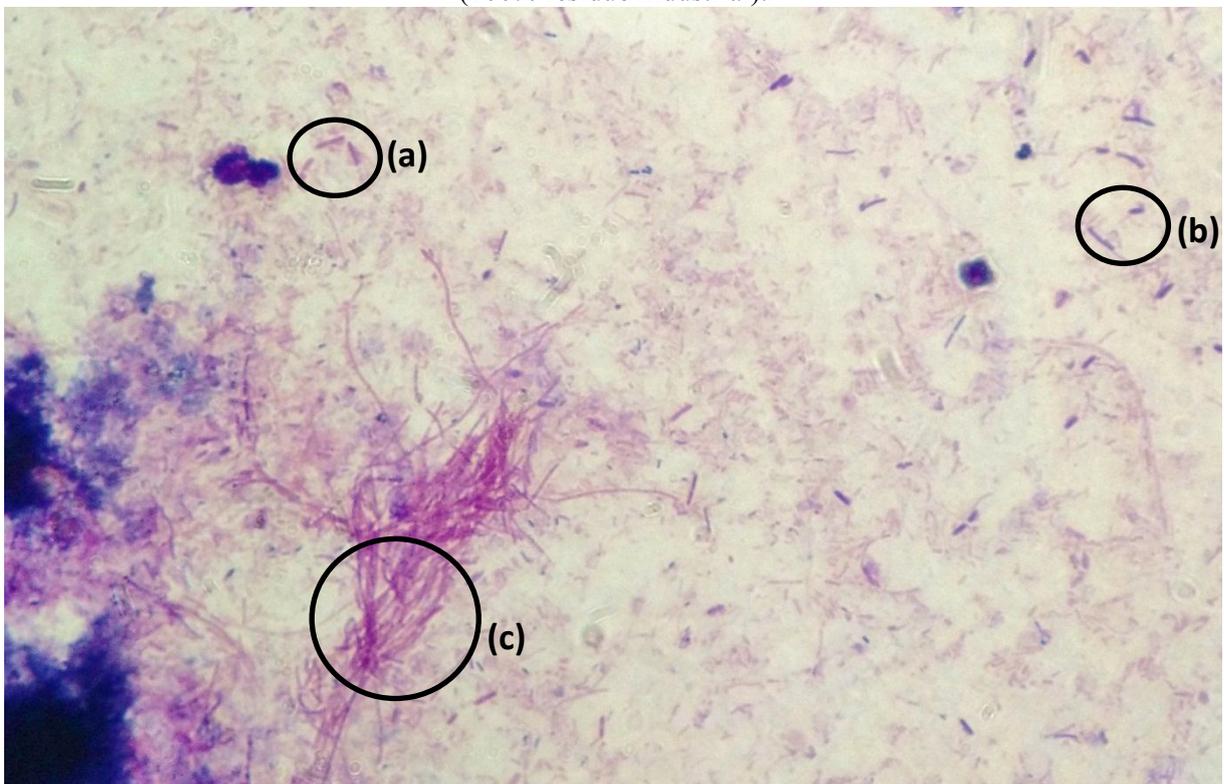
Fonte: Próprio autor

**Figura 5.21.** Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) dos reatores anaeróbios da Condição 3 (50% meio de cultivo e 50% resíduo industrial).



(a) bacilos Gram positivos; (b) bacilos Gram negativos; (c) endósporos terminais.  
Fonte: Próprio autor

**Figura 5.22.** Microscopia de luz comum (aumento 1000 X) dos reatores anaeróbios da Condição 4 (100% resíduo industrial).



(a) bacilos Gram positivos; (b) bacilos Gram negativos; (c) bactérias filamentosas.  
Fonte: Próprio autor

## 6. CONCLUSÕES

O resíduo industrial proveniente da fabricação de desinfestantes ambientais pode ser aplicado como substrato orgânico para geração de gás metano.

O resíduo de inseticidas apresentou elevadas concentrações de matéria orgânica, confirmadas em DQO, açúcares totais e sólidos. Essas evidências abrem possibilidades de seu reaproveitamento na geração de biogás em processos anaeróbios.

A produção de biogás foi verificada para proporções crescentes de resíduos de inseticidas em reatores anaeróbios. Porém, na condição 4 (100% de resíduo industrial), foi verificada a melhor eficiência na produção de biogás, com os consumos mais elevados do substrato orgânico e porcentagens mais elevadas de gás metano no *headspace*, 77,9% ao final do ensaio.

Os consórcios anaeróbios enriquecidos apresentaram morfologia bacteriana predominante de bacilos, que aliado às observações de pH reduzido do resíduo, evidenciaram a manutenção de bacilos acidófilos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADORNO MAT, HIRASAWA JS, VARESCHE MBA. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: *Headspace* (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *American J Analytical Chemistry*, 5: 2014; p. 406-414.
- ANDREOLI, C.V.; SPERLING, M. von; FERNANDES, F. *Lodo de esgotos: tratamento e disposição final*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; Companhia de Saneamento do Paraná; Belo Horizonte: 2001. 484p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; V.6)
- ANTONIO, S.M. *Análise da variação da vazão e da concentração do metano presentes nos gases gerados no aterro sanitário de Rio Claro – SP*. Trabalho de Formatura - IGCE, UNESP – Rio Claro (SP), 2012.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Monografias Autorizadas*. Regularização de Produtos – Agrotóxicos. Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acesso em 7 nov 2016.
- APHA AWWA WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*: American Public Health Association. 21th ed. American Water Works Association, Water Environment Federation; 2005 [Centennial Edition].
- AQUINO S. F. et al. *Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios*. Artigo Técnico, v. 12, n.2, 2007, p. 192-201.
- BAIRD, C. *Química Ambiental*. Tradução de Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.
- BARTACEK, J.ZABRANSKA, J., LENS, P. N. L. Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels Bioproducts e Biorefining-Biofpr*, v. 1, 2007; p. 201-214.
- BRACK, L.B. *Determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) Através da Biodigestão Anaeróbia de Materiais Colagênicos*. Trabalho de Diplomação em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre: 2012.
- BRAGA, B. et al. *Introdução à engenharia ambiental*. 2 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.
- BRASIL. *Balanço Energético Nacional 2015: Ano base 2014 / Empresa de Pesquisa Energética (EPE)*, Rio de Janeiro: 2015.
- \_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução 357/2005. Brasília: 2005.
- CHAUHAN, A.; OGRAM, A.; REDDY, K.R. Syntrophic-Methanogenic Associations along a Nutrient Gradient in the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 6, 2004; p. 3475-3484.
- CHERNICHARO, C.A.L. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; reatores anaeróbios*. 2. ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, Belo Horizonte: 2007; 380 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; V.5)

- CHIRON S., FERNANDEZ-ALBA A., RODRIGUEZ A., GARCIA-CALVO E. Pesticides chemical oxidation: state-of-the art. *Water Res.*, 34, 2000; p. 366–377.
- DEZOTTI, M.; *Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos*; E-Papers serviços editoriais; Rio de Janeiro, 2008.
- DOLFING, J.; BLOEMAN, W. G. B. M. Acitivity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *Journal of Microbiological Methods*, v. 4, n. 1, 1985; p. 1–12.
- DUBOIS, M.; et al. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 1956; p. 350- 356.
- FORESTI, E. Tratamento de esgoto. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.) *Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 18, p. 455-476.
- FREIRE R. S., PELEGRINI R., KUBOTA L. T., DURÁN N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. In: *Quím. Nova*, vol.23 n.4, São Paulo: 2000.
- HESPANHOL, I. Poluentes emergentes, saúde pública e reuso potável direto. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.) *Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 20, p. 501-538.
- LAMAISON, F.; REGINATTO V.; AMANTEE. R.; ANTÔNIO. V. Produção de Biocombustíveis a Partir da Água Residuária do Processamento da Mandioca. *2 International Workshop - Advances in Cleaner Production*. São Paulo: 2009.
- MAINTINGUER, S.I. et al. Isolation and characterization of hydrogen producing bacteria from brewery wastewater. *14 World Congress on Anaerobic Digestion*, Chile: 2015.
- MAINTINGUER, SI; FERNANDES BS, DUARTE IC, SAAVEDRA NK, ADORNO MAT, VARESCHE MBA. Fermentative Hydrogen Production by Microbial Consortium. *Int. Journal Hydrogen Energy*, 33, 2008; p. 4309-1733.
- MORI, K.; IINO, T.; SUZUKI, K-I.; YAMAGUCHI, K.; KAMAGAT, Y. Aceticlastic and NaCl-Requiring Methanogen “Methanosaeta pelagica” sp. nov., Isolated from Marine Tidal Flat Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 no. 9, 2012; p. 3416-3423.
- NARAYANAN, N.; KRISHNAKUMAR,B.; ANUPAMA, V. N.; MANILAL, V. B. Methanosaeta sp., the major archaeal endosymbiont of Metopus es. *Research in Microbiology*, no. 160, 2009; p. 600-607.
- NEVES, K. Mercado de inseticidas cresce na guerra contra as pragas urbanas. *H&C - Household & Cosméticos*, XIII. no 73, 2012. Disponível em: [http://www.freedom.inf.br/revista/hc73/saz\\_household.asp](http://www.freedom.inf.br/revista/hc73/saz_household.asp). Acesso em 28 nov 2016.
- NOMURA, T. et al. Isolation and characterization of a novel hydrogen-producing strain Clostridium sp. suitable for immobilization. *International journal of hydrogen energy*, 39, 2013; p. 1280-1287.
- NOPARAT, P. et al. Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain Clostridium beijerinckii PS-3 from fermented oil palm sap. *International journal of hydrogen energy*, 36, 2011; p. 14086-14092.

- NUVOLARI, A. O lançamento in natura e seus impactos. In: NOVULARI, A. *Esgoto Sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola*. São Paulo: Edgard Blücher, 2003. Cap. 7, p. 171-208.
- OLIVER A. P. M.; NETO, A. A. S.; QUADROS, D. G.; VALLADARES, R. E.; Manual de Treinamento em Biodigestão; *Winrock International Brasil*; Salvador: 2008.
- PATEL, G.B.; DENNIS SPROTT, G. D. Methanosaeta concilii gen. nov. sp. nov. (“Methanothrix concilii”) and Methanosaeta thermoacetophila nom. rev., comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, Vol. 40, No. 1, 1990; p. 79-82.
- PIRES, E.C.; ZAMARIOLLI, M.H.R.; NERY, V. del. Tratamento de águas residuárias industriais. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.) *Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 19, p. 477-500.
- RODRIGUES, C.V. *Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara: 2016.
- SALDIVA, P.H.N.; COELHO, M. de S.Z.S. Poluição atmosférica e saúde humana. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.) *Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 15, p. 345-366.
- SONG, Z-X. et al. Isolation and characterization of a new hydrogenproducing strain Bacillus sp. FS2011. *International journal of hydrogen energy*, 38, 2012; p. 3206-3212.
- SOUTO, G.D.de B.; POVINELLI, J. Resíduos sólidos. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.) *Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 22, p. 565-588.
- SOUTO, T. F., AQUINO, S. F., SILVA, S. Q., CHERNICHARO, C. A. L.; Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation*, 21, 2009; p. 411-424.
- SPERLING, M. von. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; Companhia de Saneamento do Paraná; Belo Horizonte: 2005. 3ed, 452p. – (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; V.1)
- SPERLING, M. von. *Princípios básicos do tratamento de esgotos*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Belo Horizonte: 1996. 211p. – (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; V.2)
- VARESCHE, M.B.A.; SAKAMOTO, I.K.; OLIVEIRA, L.L. Comunidade microbiana. In: CALIJURI, M. C.; CUNHA, D. G. F. (Org.) *Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 4, p. 75-94.
- WANG, J.; WAN, W. Factor influencing fermentative hydrogen production: A review. In: *International Journal of Hydrogen Energy*. V. 34, 2009; p. 799-811
- YASMIN, J.A.A., GUPTA, H.N., BANSAL, B.B., SRIVASTAVA, O.N., Effect of combustion duration on the performance and emission characteristics of a sparkignition engineusing hydrogen as a fuel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 25, 2000; p. 581–589.