

CONSOLIDAÇÃO DE PROTOCOLO VOLUMÉTRICO PARA O ENSAIO DE ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA (AME)

Mariana Garroux Montezuma⁽¹⁾

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo - USP. Bióloga da Cia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. Discente do Mestrado Profissional em Rede Nacional em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos – Prof. Água, pela Universidade Estadual Paulista – UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil.

Cristina Rossi Nakayama⁽²⁾

Profa. Associada Dra. do Instituto de Ciências Ambientais da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, Diadema, SP, Brasil.

Renato Grillo⁽³⁾

Prof. Assistente Dr. do Dep. de Física e Química da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil.

Endereço⁽¹⁾: ETE Barueri - Av. Pirarucu, 3.891 – Nova Aldeinha - Barueri - SP - CEP: 06440-185 - Brasil - Tel: +55 (11) 4133-3451 - e-mail: mmontezuma@sabesp.com.br

RESUMO

Apesar do ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) ser utilizado há pelo menos três décadas pela comunidade científica como ferramenta de bancada para avaliação da capacidade de produção de metano por lodos anaeróbios, existem muitas variações metodológicas e lacunas de entendimento acerca de pontos importantes para sua correta execução. Até o momento, a principal referência internacional em análises de água e esgoto, o *Standard Methods for Water and Wastewater* (APHA, 2022), ainda não incorporou em sua enciclopédia um método padronizado para a determinação da AME. Com o objetivo de definir parâmetros indispensáveis para sua execução e confiabilidade, o trabalho consistiu em sistematizar informações de fontes diversas para elaboração de um procedimento volumétrico para o ensaio de AME. O procedimento foi validado quanto à sua linearidade e repetibilidade, resultando em um coeficiente de variação (CV) de 9,44%. Espera-se contribuir para a ampliação de seu uso entre as concessionárias de esgoto, como instrumento para avaliação de rotina, ou como recurso para definição de novos projetos.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade Metanogênica, Lodo Anaeróbio, Tratamento de Esgoto

INTRODUÇÃO

Tecnologias biológicas anaeróbias, como digestores convencionais, reatores de fluxo ascendente (RAFA), e filtros biológicos, são frequentemente utilizados no tratamento de esgotos, tanto em sua fase líquida como sólida. O principal indicador de eficiência para essas tecnologias, além da remoção da carga orgânica, é sua conversão em biogás, em última instância metano. A quantificação da produção de metano, por sua vez, é relevante e necessária a depender do projeto de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) adotada, isto porque o metano pode ser utilizado como fonte de energia em processos subsequentes interna ou externamente à Estação.

Os principais parâmetros utilizados no monitoramento de equipamentos anaeróbios são: pH, remoção de sólidos voláteis, acidez total, alcalinidade, e a relação C: N: P. No entanto, o metabolismo anaeróbio é muito particular, por se basear em relações sintróficas que envolvem grupos diversos de microrganismos em um equilíbrio delicado; de modo que, nem sempre esses parâmetros básicos são suficientes no esclarecimento de distúrbios operacionais e/ou na definição de variáveis de projeto.

Dentro de um reator anaeróbio a matéria orgânica complexa é convertida essencialmente em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, por meio de reações metabólicas de fermentação (sem aceptor final de elétrons) ou respiração (utilizando aceptores de elétrons inorgânicos como NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2). A microbiota anaeróbia reúne dois domínios diferentes, o Eubacteria e o Archaea. Esses organismos se organizam genericamente, de modo sequencial, em quatro etapas distintas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e

metanogênese. A acetogênese, em particular, se dá por meio de algumas reações não espontâneas ($\Delta G_0 > 0$), de modo que sua ocorrência é totalmente dependente da etapa seguinte, onde há o sequestro de íons hidrogênio do meio reacional. Segundo Harper & Pohland (1986), é necessário que a pressão parcial de hidrogênio seja mantida extremamente baixa, da ordem de 10^{-4} a 10^{-6} atm.

O ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) permite avaliar o funcionamento desse consórcio biológico de maneira completa, ou isoladamente por grupo funcional. O ensaio pode ser assim definido:

A atividade metanogênica específica (AME) pode ser definida como a capacidade máxima de produção de metano por um consórcio de microrganismos anaeróbios, realizada em condições controladas de laboratório, para viabilizar a atividade bioquímica máxima de conversão de substratos orgânicos a biogás (AQUINO et al, 2007, p. 192).

As utilidades do ensaio de AME são variadas: i) identificar substratos tóxicos ou inibidores à microbiota; ii) verificar a degradabilidade de substratos específicos; iii) monitorar mudanças na qualidade do lodo de reatores; iv) estimar a máxima carga orgânica aplicada; v) avaliar parâmetros cinéticos.

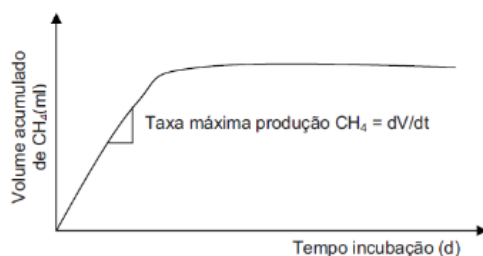
É importante distinguir o ensaio de AME daquele denominado *Biochemical Methane Potential (BMP)*, em português Potencial Bioquímico de Metano, o qual é conduzido da mesma forma que o AME, porém, expresso diferentemente. O AME é a medição da taxa máxima de geração de metano, por grama de inóculo exposto; enquanto o *BMP* é a quantificação do metano acumulado até a digestão completa, por grama de substrato fornecido (ou removido) (equação 1 e 2). Nesse sentido, Astals et al (2020) tratam o AME como um ensaio 'metabólico', já que expressa a cinética da reação de degradação.

$$BMP = \frac{\text{Volume acumulado de CH}_4}{\text{Massa de substrato}} \quad \text{equação (1)}$$

$$AME = \frac{\text{Coef. Linear da curva de CH}_4 \text{ acumulado}}{\text{Massa de inóculo} * \text{tempo}} \quad \text{equação (2)}$$

Em linhas gerais, a execução do AME é feita por meio de medições periódicas da produção de metano em reatores contendo uma mistura de biomassa, substrato e solução nutritiva. O volume de metano encontrado é plotado em um gráfico de volume acumulado por tempo de reação (figura 1). A curva, de forma característica, exibe um primeiro trecho linear de maior inclinação, seguido de uma fase de estabilização. A derivada do segmento linear da curva, ou o coeficiente linear da função de primeiro grau deste trecho, corresponde à taxa máxima de produção de metano, a qual deve ser dividida pela massa de inóculo, ou biomassa, medida indiretamente em termos de sólidos totais voláteis (STV).

Figura 1 – Determinação gráfica da taxa máxima de produção de metano.



Fonte: Chernicharo (2016).

Segundo Soto et al (1993), o trecho inicial de degradação se comporta como uma reação de ordem zero, porque o substrato está em excesso e o único fator determinante para a geração de biogás é a condição ou capacidade do inóculo. Sem excesso de substrato fica difícil definir se um baixo desempenho na geração de gás está relacionado com a inibição e/ou baixa qualidade do inóculo utilizado, ou com uma quantidade limitada de alimento fornecido.

A medição do metano gerado durante o ensaio de AME pode ser realizada por métodos volumétricos, manométricos e gravimétricos. O manométrico consiste em converter a pressão positiva gerada dentro do frasco-teste em volume de biogás. Para tal, pode-se utilizar diferentes mecanismos de medição, sendo o aparato comercial Oxitop® uma novidade que vem ganhando projeção. Os métodos volumétricos, por sua vez, podem ser divididos em 3 tipos: i) medição direta do volume gerado por meio de seringa esmerilhada, seguido de análise de composição por cromatografia; ii) medição indireta do número de moles encontrados em volume fixo e pressão constante, em função da relação de proporcionalidade obtida pela área cromatográfica; iii) e medição direta do volume de metano após lavagem do gás carbônico em hidróxido de sódio. Cada uma dessas configurações apresenta particularidades e exigências instrumentais diferentes.

Até o momento, a principal referência internacional em análises de água e esgoto, o *Standard Methods for Water and Wastewater* (APHA, 2022), ainda não incorporou em sua enciclopédia um método padronizado para a determinação da atividade metanogênica de lodos anaeróbios. Em nível nacional, também não há um protocolo definido pela ABNT. Já na literatura técnica, as metodologias utilizadas diferem entre si nos procedimentos adotados para a montagem dos reatores (concentração de inóculo, tipo e concentração de substrato, relação alimento/microrganismo, uso e tipo de solução nutritiva, tempo de incubação, etc), na forma de quantificação do metano produzido, na relevância dada aos gases de menor geração anaeróbia, e na expressão do resultado.

OBJETIVO

Elaborar um protocolo para o ensaio de AME por meio do método volumétrico com análise cromatográfica da composição do biogás, contribuindo assim para facilitar e ampliar sua realização pelas concessionárias de esgoto.

METODOLOGIA

- **Revisional**

Em uma primeira etapa, levantou-se junto à literatura científica nacional e internacional os trabalhos que utilizaram o AME ou o *BMP* como ferramenta aplicada para avaliações diversas, ou que trataram especificamente das opções metodológicas e variáveis de interesse desses ensaios. A busca por artigos relacionados aos assuntos mencionados foi feita no Google Acadêmico por meio das seguintes expressões ou palavras-chave, preferencialmente em inglês: “*anaerobic digestion*”, “*methanogenesis*”, “*specific methanogenic activity*”, “*biochemical methane potential*”, “*validation + essay + BMP*”, “*methanogenic + activity + application*”. As plataformas direcionadas pelo Google Acadêmico foram principalmente: *Elsevier*, *Springer*, *IWA Publishing*, *Scielo Brasil*, e *Wiley Online Library*.

- **Prática**

A partir do levantamento dos recursos materiais necessários para realização de cada um dos diferentes métodos de ensaio de AME, identificou-se quais os recursos materiais disponíveis no laboratório utilizado como base locacional para execução desta pesquisa, para então definir o escopo do trabalho, o qual se limitou ao ‘método volumétrico com análise da composição do biogás’.

O principal elemento que embasou a definição desse escopo foi principalmente a característica do cromatógrafo gasoso disponível, um modelo Micro GC C2V-200 da marca *Thermo Scientific*®, que opera com argônio como gás de arraste numa pressão de 90kPa, detecção por condutividade térmica, temperatura de injeção de 120°C, colunas capilares de 60 x 100 x 12,5 mm, e *loop* de injeção.

Operacionalmente, seu *loop* de injeção demanda um fluxo de entrada que, considerando também a necessária lavagem do sistema interno entre tratamentos, acaba por consumir um volume grande de amostra (cerca de 7 ml). Assim, desconsiderou-se adotar o método de medição volumétrico que se baseia na avaliação quantitativa desse gás indiretamente pela área cromatográfica, pois é um método que demanda amostragem em microseringa com trava de pressão, ou seja, utiliza um volume muito reduzido. O método volumétrico com lavagem em hidróxido de sódio também foi desconsiderado em função de sua difícil montagem, e ainda que barato, é limitado na identificação dos gases gerados em alguns tipos de tratamento com substratos específicos.

Foram realizados testes preliminares com o objetivo de verificar: o impacto da pré-digestão do inóculo no resultado final; a sensibilidade do ensaio à toxicidade por sal; efeitos de variações nos elementos da montagem, por exemplo, na proporção entre substrato e inóculo (S/I) e no volume de *headspace*; comprovação de sua linearidade; e a repetibilidade do método (validação de sua precisão).

O ensaio de linearidade foi executado a 30°C, em triplicata, utilizando-se um inóculo com 11,8 g STV/L e uma solução estoque de glicose com 15g DQO/L. O inóculo tinha uma relação STV/ST de 58%, 0,05 de acidez volátil sobre a alcalinidade total (ideal de 0,1 a 0,2), e 0,24 de alcalinidade de ácidos voláteis sobre a alcalinidade bicarbonato (ideal < 0,3). Foi adotada a mesma relação S/I, porém o Tratamento 1 foi montado em frasco de 1L, e o Tratamento 2 em frasco de 500ml.

Já o ensaio de validação da repetibilidade foi executado a 30°C, com seis réplicas, ofertando-se acetato em solução estoque de 40 g/L em DQO, a um inóculo com 14,3 g/L em STV. O inóculo utilizado tinha uma relação STV/ST de 56%, 0,06 de acidez volátil sobre a alcalinidade total, e 0,21 de alcalinidade de ácidos voláteis sobre a alcalinidade bicarbonato.

Os dois lotes de inóculo, correspondentes aos dois ensaios citados, foram pré-digeridos por 7 dias a 30°C antes das montagens descritas na tabela 1.

Tabela 1. Montagem experimental dos ensaios apresentados neste trabalho.

Parâmetro	Linearidade (com glicose)		Repetibilidade (com acetato)
	Trat. 1 (3x)	Trat. 2 (3x)	Réplicas (6x)
Carga de substrato (g DQO)	1	2	2
Concentração de substrato (g DQO/L)	4,2	4,2	6
Carga de inóculo (g STV)	2	4	4
Concentração de inóculo (g STV/L)	8,3	8,3	11
Relação S/I (DQO/STV)	0,5	0,5	0,5
Montagem do reator			
Volume de reação (ml)	240	480	350
Volume de headspace (ml)	360 (60%)	720 (60%)	850 (71%)
Volume de substrato (ml)	133,3	133,3	50
Volume de inóculo (ml)	367	339,0	279,7
Solução nutritiva (ml)	49,7	7,7	20,3

Fonte: elaboração própria.

RESULTADOS

• Revisionais

A proporção entre substrato e inóculo é de fundamental importância para obtenção de uma boa curva, e consequentemente bons resultados. Essa proporção, ou relação substrato/inóculo (S/I), é calculada em função da massa adicionada de cada um desses parâmetros, ou seja, pela carga. Alguns pesquisadores se debruçaram sobre o efeito da proporcionalidade sobre o resultado da AME (PENNA, 1994; MONTEGGIA, 1997; RAPOSO et al, 2006; FERNANDEZ et al, 2001 apud ANGELIDAKI et al, 2006, p. 928; NEVES et al, 2004 apud ANGELIDAKI et al, 2009, p. 928; PARRA et al, 2015), sendo que Wang et al (2015) foram além e avaliaram também o efeito da concentração desses elementos (substrato e inóculo) sobre o resultado final.

Parra et al (2015), assim como Harper & Pohland (1986), identificaram que razões S/I abaixo de 2 (em STV) garantem melhores resultados de *BMP*, pois o excesso de alimento desestabiliza o processo anaeróbio devido ao

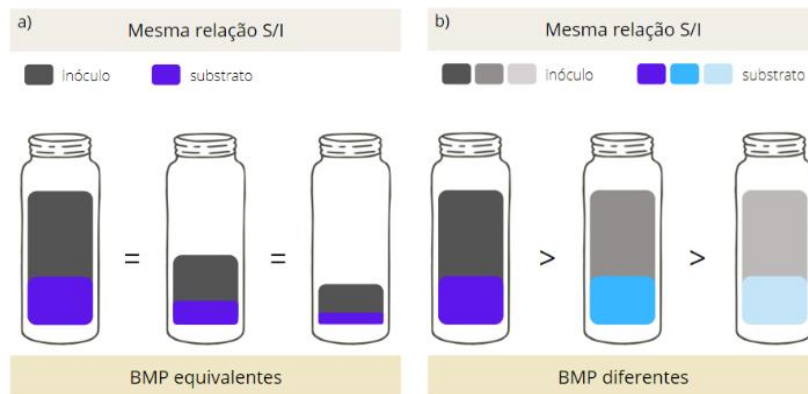
acúmulo de ácidos graxos voláteis, promovendo uma acidificação que não estabiliza por conta da baixa capacidade de tamponamento do sistema. No entanto, é preciso assegurar que a carga de substrato não seja tão baixa a ponto de não se obter um trecho linear na primeira fase de degradação.

O protocolo alemão VDI 4630 (2006) restringe mais essa faixa de trabalho e recomenda que a relação S/I deve ser $\leq 0,5$ a fim de evitar a referida inibição provocada por elementos intermediários da degradação anaeróbia, como ácidos graxos de cadeia curta e H_2 . E a concentração máxima do substrato, sendo recomendado o uso de celulose, não deve exceder 10% em STV.

O trabalho de Wang et al (2015) é relevante nesse debate em razão da configuração experimental adotada e dos resultados obtidos. Com o intuito de identificar o limite inferior da faixa de trabalho para a concentração inicial de substrato, eles compararam o *BMP* obtido a partir de montagens experimentais com a mesma relação S/I (fixa em 0,5), porém com variações tanto na concentração inicial de inóculo, quanto na carga de substrato ofertada. A carga de substrato foi ajustada de duas maneiras diferentes: por meio do volume, maior ou menor, inserido no frasco; ou por meio de diluição, com conseqüente variação na concentração inicial de substrato (figura 2). Como conclusão, Wang et al (2015) afirmam que a diluição do inóculo ou substrato pode introduzir subestimação do potencial de geração do metano.

Além da comparação estatística entre os resultados de *BMP* obtidos em cada tratamento, Wang et al (2015) também inseriram as informações no modelo matemático de Monod, que descreve o crescimento biológico em situações com limitação da fonte de alimento, e o R^2 foi relevante. Essa aderência ao modelo de Monod demonstra que as concentrações menores de substrato sinalizam à microbiota uma menor oferta de alimento, mesmo a relação S/I se mantendo igual em todos os tratamentos.

Figura 2 – Reelaboração visual do Experimento I realizado por Wang et al (2015).



Nota: a) tratamento sem diluição (mesma concentração de substrato); e b) tratamento com diluição.
Fonte: elaboração própria.

Quanto à homogeneização, Wang et al (2016) detectaram em seus experimentos que esse é um parâmetro particularmente importante para lodos viscosos. Já para lodos mais diluídos, a homogeneização não é um fator significativo em termos de melhora na eficiência de oxidação da matéria orgânica, em concordância com o protocolo alemão VDI 4630 (2006) que considera suficiente a homogeneização dos reatores uma vez ao dia.

Quanto ao volume de espaço aéreo nos frascos reatores, Hafner & Astals (2019) nas suas condições de trabalho, identificaram que montagens com *headspace* pequenos, por exemplo abaixo de 25%, estão sujeitas a maiores riscos de vazamento e erros de medição.

Segundo Aquino et al (2007), como critério de validação do resultado, deve-se assegurar que a determinação da taxa máxima, corresponda ao trecho linear cujo consumo representa no mínimo 50% do substrato adicionado. No entanto, tal verificação fica impraticável em se tratando de substratos mistos como lodo de processo de ETEs, em que uma parcela da matéria orgânica é particulada. Os mesmos pesquisadores sugerem finalizar o ensaio quando a curva de produção de metano faz a passagem da fase exponencial para a estacionária (AQUINO et al, 2007).

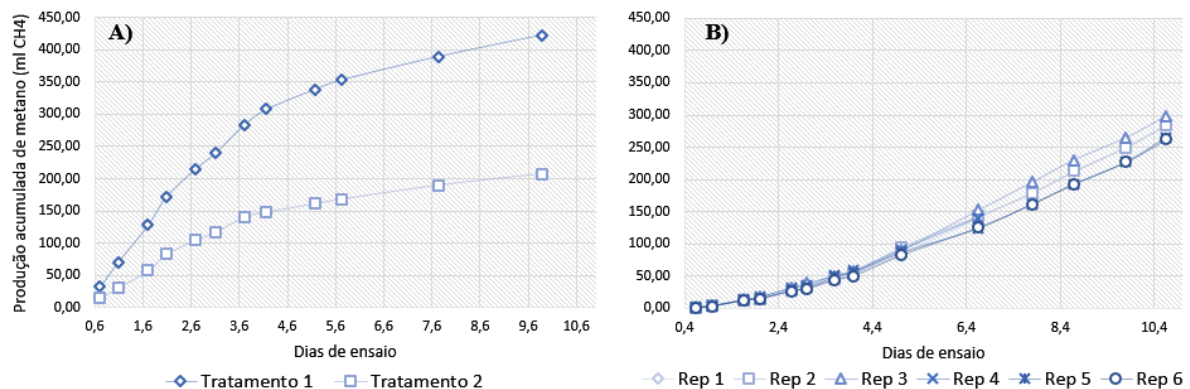
Quanto à aplicação do AME, Ray et al (2017) utilizaram o ensaio para comprovar a efetividade da exposição de células de combustível microbiana (MFC) a extrato fúngico, visando inibição da atividade metanogênica e assim ganhar eficiência em seu processo. Koster & Lettinga (1984) avaliaram o impacto do nitrogênio amoniacal sobre lodo de RAFA, e por meio do AME identificaram que as arqueias que clivam acetato são mais afetadas do que aquelas que consomem hidrogênio, e também que elas podem se adaptar à uma exposição gradual até valores acima de 1700 mg/L sem aclimatação. Batstone et al (2015) utilizaram o AME para mensurar o impacto negativo de tecnologias de adensamento de lodo (peneiras rotativas, filtro-prensa, centrifugação) na capacidade de produzir metano.

- **Práticos**

As curvas correspondentes aos tratamentos do ensaio de linearidade estão expressas na figura 3-A já como média das triplicatas. Elas apresentam redução na velocidade de produção de metano a partir do quarto dia de ensaio. Já o teste de repetibilidade manifestou uma velocidade de geração de metano muito mais lenta (figura 3 – B).

O resultado da AME média do ensaio de linearidade, com o uso de glicose e lodo de processo da ETE Barueri (SABESP), é de 24,6 mlCH₄/gSTV.d (seco e na CNTP). Tanto a proporção S/I de 2:4, quanto a de 1:2, se mostraram suficientes para obtenção de um trecho inicial linear de produção de metano, bem como geração de pressão positiva ao longo dos 12 dias de ensaio. As tentativas de obter o trecho de linearidade mais consistente (R² > 0,99), com um maior número de pontos, estão apresentadas na tabela 2. O período entre o 0,7º ao 2,1º dia foi selecionado como a melhor opção segundo o critério mencionado.

Figura 3 - Produção acumulada de metano nos ensaios de: A – linearidade; e B - repetibilidade.



Fonte: elaboração própria.

Tabela 2 – Obtenção da AME do ensaio de linearidade, adotando o trecho do 0,7º ao 2,1º dia.

Tratamento	R ²	Coef. Linear	AME (mlCH ₄ /gSTV.d)
1	0,9983	100,23	25,06
2	0,9901	48,22	24,11

Fonte: elaboração própria

O ensaio de validação de repetibilidade do método resultou em um coeficiente de variação (CV) de 9,44%, calculado com base na equação 3, onde s é o desvio padrão, e \bar{x} a média. O desvio padrão e a média foram calculados com base nos valores de AME de cada replicata (detalhados na tabela 3). Para obtenção desses valores, o período selecionado foi do 4º ao 8,7º dia. A média da AME encontrada nesse teste é de 8,108 mlCH₄/gSTV.d, conforme tabela 3.

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{equação (3)}$$

$$CV (\%) = \frac{0,765}{8,108} \cdot 100 = 9,44\%$$

Tabela 3 – Obtenção da AME do ensaio de repetibilidade, adotando o trecho do 4° ao 8,7° dia.

Réplica	Coefficiente linear	R ²	AME (Nml CH ₄ /g STV.dia)
1	33,911	0,9994	8,478
2	32,923	0,9973	8,231
3	37,081	0,9992	9,270
4	Réplica apresentou falha de estanqueidade no 7 dia de ensaio		
5	28,472	0,9948	7,118
6	29,768	0,9977	7,442

Fonte: elaboração própria.

DISCUSSÃO

O coeficiente de variação encontrado foi coerente e satisfatório, tanto quando comparado àqueles encontrados para outros ensaios biológicos, por exemplo a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) em que a incerteza é de 15% para 198 mg/L, quanto quando comparada à incerteza de ensaios gravimétricos, como o SST que é de 10%, segundo o SMWW (APHA, 2020). No entanto, a população utilizada não foi alta, cinco, enquanto os manuais de validação recomendam sete réplicas ou mais.

Convém realizar novamente o ensaio de repetibilidade utilizando outros substratos, por exemplo o lodo de processo de ETE. Além disso, não foi realizada a homogeneização do inóculo, por meio de peneiramento ou liquidificação, o que poderia reduzir a incerteza associada à montagem.

Segundo Angelidaki et al (2009), a AME de lodo alimentado com acetato deve ser de no mínimo 0,1 gDQO/gSSV.d. Convertendo a unidade de expressão, o resultado médio encontrado no ensaio de repetibilidade foi de 0,04 gDQO/gSSV.d, isto é, um valor bastante inferior ao preconizado pelos autores mencionados. No entanto, este resultado não invalida o coeficiente de variação, já que este não depende da qualidade do inóculo, que no caso foi o mesmo utilizado em todas as réplicas. O CV deve expressar a soma das incertezas embutidas em montagem, incubação, preparação de amostra, ou seja, elementos que estão presentes independentemente da qualidade do inóculo.

A utilização de apenas acetato como fonte de carbono e energia subestima em no mínimo 30% a capacidade máxima de produção de metano (AME), pois as metanogênicas que consomem hidrogênio têm maiores taxas de crescimento do que as que consomem acetato (HARPER & POLAND, 1986, PAVLOSTATHIS & GIRALDO-GOMEZ, 1991, apud AQUINO et al, 2007, p. 193). Os dois testes de validação apresentados neste trabalho confirmam esse comportamento, já que foram montados com a mesma relação S/I e com inóculo proveniente da mesma fonte, ainda que não da mesma data, gerando valores de AME que se diferenciam em 67%.

Os valores de AME obtidos para cada tratamento do ensaio de linearidade podem ser considerados iguais, pois sua diferença é menor do que o coeficiente de variação do método. Este teste demonstra que, se atendidas boas condições de montagem, inóculos iguais devem manifestar taxas cinéticas de geração de metano similares, já que essa taxa está diretamente relacionada com a capacidade metabólica do inóculo quando sujeito à uma fonte de alimento, que no caso foi a mesma para os dois tratamentos.

CONCLUSÃO

Com base na revisão de literatura realizada, estabeleceram-se normativas, boas práticas, e condições mínimas que, juntamente com informações detectadas nos ensaios experimentais, foram sistematizadas em um protocolo próprio para o ensaio de AME, o qual está descrito a seguir.

- **Princípio do Método**

O ensaio de atividade metanogênica específica (AME) determina a capacidade da microbiota em produzir metano a partir de um substrato específico, sob condições controladas de laboratório. Neste método, a quantificação do metano gerado se baseia em amostragens periódicas com seringas esmerilhadas, seguidas da análise da composição do biogás por cromatografia gasosa. A maior taxa de produção de metano acumulado é normalizada pela massa de inóculo exposta, podendo ser expressa em $\text{mlCH}_4/\text{gSTV.d}$.

- **Campo de Aplicação**

Este procedimento pode ser utilizado tanto para substratos conhecidos, quanto para substratos mistos; bem como, inóculo proveniente de digestor, ou proveniente de reator anaeróbico de fluxo ascendente.

- **Requisitos**

- **Configuração do cromatógrafo**

O método cromatográfico deve ser construído a partir da calibração e integração realizadas com mistura padrão certificada, que contenha em sua composição: metano, gás carbônico, hidrogênio, oxigênio, gás sulfídrico, em proporção similar àquelas tipicamente resultantes da digestão anaeróbia; bem como o gás utilizado na troca de atmosfera, por exemplo, o nitrogênio.

NOTA: A presença de hidrogênio no padrão de calibração é particularmente recomendável em tratamentos que utilizam glicose como substrato, em função da significativa produção desse gás nos primeiros dias de ensaio.

- **Qualidade das amostras**

Idealmente, as amostras de inóculo retiradas de reator anaeróbico real, bem como de substrato misto de processo de ETE, devem obedecer aos requisitos da Tabela 4.

Tabela 4 – Requisitos qualitativos das amostras

Parâmetro	Inóculo	Substrato
Alcalinidade total	$> 1,5 \text{ g CaCO}_3/\text{L}^{[8]}$	não se aplica
Acidez volátil	$< 1 \text{ g CH}_3\text{COOH}/\text{L}^{[8]}$	não se aplica
pH	$7 < x < 8,5^{[8]}$	não se aplica
NH_4	$< 2,5 \text{ g}/\text{L}^{[8]}$	$< 2,5 \text{ g}/\text{L}$
Relação STV/ST	$> 0,5^{[19]}$	$> 0,8^{[19]}$
Concentração no reator fonte	$15 \text{ a } 20 \text{ g STV}/\text{L}^{[8]}$	$> 20 \text{ g STV}/\text{L}$

Fonte: elaboração própria.

NOTA: O critério de aceitação para amostras com características distintas das referidas na tabela acima depende do objetivo do ensaio de AME que será conduzido.

O inóculo deve estar homogêneo, para tal, convém peneirá-lo para remoção de materiais estranhos^[3].

- **Ensaio com substrato de referência**

Trata-se de um teste controle que permite identificar mudanças na condição do inóculo a partir do acompanhamento em carta-controle.

O ensaio com substrato de referência deve ser executado conforme o ensaio definitivo.

A AME de um inóculo rotineiramente monitorado deve se manter dentro dos limites da carta controle, a menos que estejam ocorrendo alterações operacionais que possam desequilibrar o andamento de seu metabolismo anaeróbico. E, portanto, o ensaio com substrato de referência permite identificar com maior facilidade as oscilações na qualidade de um inóculo, por isolar apenas essa variável.

Sugere-se como substrato de referência a utilização de acetato, caso se pretenda avaliar apenas a metanogênese; ou a glicose, caso se pretenda avaliar o metabolismo anaeróbico como um todo.

- **Método de ensaio**

- **Reagentes**

Todos os reagentes utilizados na realização do ensaio devem ser de grau analítico P.A, e gases com grau de pureza acima de 99,99%.

A solução nutritiva inicia com o preparo das duas soluções cujas receitas constam na tabela 5. A solução nutritiva 1, após esterilização, pode ser armazenada por até 3 meses à 4°C, e a solução 2, por até 4 meses^[1].

Tabela 5 – Composição da solução nutritiva

Nutriente	Concentração (mg/L)	Finalidade
Solução 1		
NaHCO ₃	1.000	Fonte de alcalinidade
KH ₂ PO ₄	650	Macronutriente e fonte de alcalinidade
K ₂ HPO ₄	150	Macronutriente e fonte de alcalinidade
NH ₄ Cl	500	Macronutriente
MgCl ₂	100	Macronutriente
CaCl ₂ .2H ₂ O	100	Macronutriente
Na ₂ S.7H ₂ O	50	Agente redutor
Extrato levedura	50	Fonte de vitaminas
Solução 2		
FeCl ₃ .6H ₂ O	2	Micronutriente
ZnCl ₂	0,05	Micronutriente
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,03	Micronutriente
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5	Micronutriente
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,05	Micronutriente
AlCl ₃ .6H ₂ O	0,05	Micronutriente
CoCl ₂ .6H ₂ O	2	Micronutriente
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,05	Micronutriente
H ₃ BO ₃	0,01	Micronutriente

Fonte: adaptado de Aquino et al (2007).

Em capela de exaustão, pesar e adicionar separadamente o sulfeto de sódio, previamente seco, na solução 2.

Submeta a solução 1 a fluxo de nitrogênio inerte por alguns minutos.

À solução 2 deve-se adicionar 1 ml/L de HCL concentrado a fim de evitar a formação de precipitados.

A solução nutritiva final é a mistura de 1 ml da solução de macronutrientes (1) para 1L da solução de micronutrientes (2).

- **Equipamentos e materiais**

Para execução deste protocolo é necessário:

- Cromatógrafo gasoso com detecção por condutividade térmica, e fase sólida adequada aos gases da mistura que se pretende identificar;
- Provetas, pipetas de vidro e balões volumétricos;
- Incubadora com controlador de temperatura;
- Seringa esmerilhada de vidro, de capacidade volumétrica compatível com o tamanho do frasco-reator;
- Frascos de borossilicato equipados com rosca vazada e septo de borracha butílica;
- Agulhas cirúrgicas de 20 x 5,5 mm;
- Seringa descartável de volume compatível com sistema de injeção do cromatógrafo;
- Sistema de troca de atmosfera alimentado com gás nitrogênio de alta pureza;
- Balança analítica.

NOTA: Deve-se trocar os septos de borracha de butila quando estiverem ressecados e com excesso de uso (perfurações). As agulhas devem ser trocadas numa frequência maior, por volta de 4 dias de uso, pois enferrujam facilmente sob ação do gás sulfídrico.

○ **Coleta e armazenamento**

A coleta do inóculo a ser avaliado no ensaio de AME deve ser proveniente de um reator de escala real, seja RAFA ou Digestor Anaeróbio, o qual deve obedecer aos requisitos da Tabela 6.

O inóculo a ser utilizado deve ser o mais fresco possível, se necessária armazenagem, esta não deve exceder 30 dias à 4°C^[5].

O substrato por sua vez, caso se trate de lodo misto, não deve ser armazenado por mais de 5 dias à 4°C; se necessário prolongamento, congelar sob -20°C^[12].

○ **Pré digestão**

A pré digestão do inóculo consiste em incubá-lo nas mesmas condições ambientais do ensaio definitivo por cerca de 7 dias, sem oferta de alimento adicional. Tal prática garante a degradação completa de qualquer resíduo alimentar que possa não ter sido degradado por completo no reator fonte do inóculo. Desse modo, o inóculo se mantém em condição de endogenia.

Antes da incubação, por meio do auxílio de uma pipeta de vidro, os frascos de reação devem ser insuflados com gás nitrogênio em sua fase líquida e aérea por cerca de 3 minutos, seguido de rápido fechamento do tampão de borracha.

O biogás gerado deve ser esgotado diariamente por meio da inserção de agulhas no septo de borracha, em selo hídrico, sem necessidade de efetuar nenhum tipo de medição.

A pré digestão é fundamental para uma correta expressão dos resultados da AME, já que a quantidade de STV no inóculo deve refletir apenas a microbiota, e não possível alimento residual não contabilizado.

NOTA: O uso de um grupo branco, isto é, reatores preenchidos apenas com inóculo, também pode ser utilizado em substituição à pré-digestão, no entanto, sua adoção exige realização de análise cromatográfica com consumo de recursos. A pré-digestão também é mais vantajosa do que a adoção de grupo branco porque funciona como uma etapa de formatação do inóculo às condições ideais de trabalho, por exemplo em relação aos parâmetros acidez volátil e alcalinidade que, porventura, podem estar desenquadrados no reator fonte.

○ **Precisão e interferentes**

Alguns fatores podem afetar o bom desempenho do ensaio, à despeito de possíveis erros de montagem experimental, são eles:

- Flutuações de temperatura dentro do reator, as quais podem decorrer de problemas operacionais da estufa incubadora, ou de tempo excessivo fora da incubadora no momento das medições de volume;

- Presença de oxigênio dentro do reator, em decorrência de falhas na troca de atmosfera e/ou quantidade insuficiente de agente redutor (sulfeto de sódio) na solução nutritiva. Sendo que pode haver aumento dessa interferência se o reator estiver sob homogeneização constante;
- Ausência ou baixa frequência de mistura, principalmente antes das medições, o que aprisiona parte do gás na fração líquida do reator;
- Produção de gás maior do que a capacidade volumétrica da seringa, demandando uma segunda medição até a equalização com a temperatura ambiente. Esta prática distorce o volume produzido, pois a primeira medição é feita com o gás em uma pressão interna maior do que a externa, de modo que o volume é subestimado;
- Possível vazamento pelo septo de borracha, o qual pode ser identificado pela pesagem do reator em balança semianalítica antes e depois de cada medição e purga;
- Obstrução parcial da agulha, o que dificulta a passagem de gás e distorce as medições.

- **Procedimentos**

- **Ensaio preliminar**

Um ensaio preliminar pode ser realizado para estabelecer a montagem ideal (volume de reação, carga e concentração de substrato, carga e concentração de inóculo) a ser utilizada no ensaio definitivo.

O ensaio preliminar, após a pré-digestão do inóculo, inicia com a experimentação de mais de uma montagem, as quais visam a obtenção de um gráfico de produção acumulada de metano que contenha um trecho linear nítido, isto é, período no qual o substrato encontra-se em excesso e a velocidade de reação é dada somente pela capacidade do inóculo.

Além disso, é necessário que a montagem proposta resulte em uma boa produção de metano, suficiente para gerar pressão positiva de modo a propiciar as medições de volume.

O ensaio preliminar é conduzido nas mesmas condições do ensaio definitivo. Para tal, planeje as montagens preliminares com auxílio da tabela 6.

Com a manipulação frequente do mesmo inóculo e substrato orgânico, a execução do ensaio preliminar se torna menos relevante.

- **Ensaio definitivo**

O ensaio definitivo, bem como o ensaio preliminar, deve ser planejado com auxílio da tabela 6.

As concentrações originais de matéria orgânica no substrato e no inóculo devem ser obtidas a partir de ensaios de sólidos voláteis e/ou demanda química de oxigênio, antes da montagem do ensaio, e no caso do inóculo, após a pré digestão.

Utilize a tabela 6, variando as cargas de substrato, de inóculo, e o volume de reação, a fim de obter boas condições de trabalho. O volume de reação não deve superar 75% da capacidade do frasco reator^[8]. E, a relação alimento/microrganismo deve se manter preferencialmente entre 0,4 e 0,6.

Tabela 6 – Organização de planilha para montagem dos reatores

Amostras originais	
Concentração substrato (g STV ou DQO/L)	Cs
Concentração inóculo (g STV/L)	Ci
Parâmetros do teste	
Carga substrato (g STV ou DQO)	Ms
Concentração substrato (g STV ou DQO/L)	$(Ms*1000)/Vr$
Carga inóculo (g STV)	Mi
Concentração inóculo (g STV/L)	$(Mi*1000)/Vr$



Relação S/I (STV ou DQO/STV)	Ms/Mi
Volume de reação (ml)	V _r
Montagem do reator	
Volume de substrato (ml)	$(M_s \cdot 1000) / C_s$
Volume de inóculo (ml)	$(M_i \cdot 1000) / C_i$
Solução nutritiva (ml)	$V_r - \{[(M_s \cdot 1000) / C_s] + [(M_i \cdot 1000) / C_i]\}$

Fonte: elaboração própria.

Convém optar por montagens que exijam um menor volume de solução nutritiva, pois isso evita diluições excessivas com consequente interferência no desempenho do ensaio.

A concentração de STV no inóculo original (C_i) é limitante no momento de definição da montagem, isto é, quanto mais denso o inóculo, maior a margem de trabalho.

Prepare as soluções-teste no momento da realização do ensaio utilizando provetas e/ou pipetas, obedecendo os volumes de amostra e água de diluição.

Troque a atmosfera dos frascos de reação fluxionando gás nitrogênio na fase líquida e aérea com auxílio de uma pipeta de vidro por cerca de 3 minutos. Eleve devagar a pipeta de vidro, aumente o fluxo de injeção, e então feche rapidamente o tampão de borracha e rosqueie a tampa com firmeza.

Execute o ensaio de AME em triplicata, tanto controle quanto tratamentos (se houver), pois isto diminui sua incerteza.

Mantenha os reatores na incubadora na temperatura desejada e aguarde de 30 a 60 minutos até se aclimatarem. Na sequência retire-os individualmente e faça uma purga em selo hídrico para igualar a pressão interna com a atmosférica.

Nos quatro primeiros dias de ensaio a velocidade de reação é mais acelerada, de modo que pode ser necessário realizar ao menos duas medições diárias, haja visto que não se deve deixar a produção de biogás exceder o volume máximo da seringa esmerilhada utilizada.

Mantenha a seringa dentro da estufa incubadora, pois isso diminui a incerteza causada pelo resfriamento do gás em contato com o vidro.

Antes de iniciar a medição, agite algumas vezes o reator de maneira cíclica e anticíclica, porém com cuidado para evitar que o líquido alcance o septo de borracha.

Insira a seringa com a agulha em posição diagonal em relação ao plano do tampão de borracha e orifício virado para cima. Permita que o gás adentre a seringa até equalização com a pressão atmosférica ambiente. Registre o valor medido, bem como a data e hora da medição.

Se o seu dispositivo de injeção no cromatógrafo for compatível com o diâmetro de abertura da seringa esmerilhada, retire-a rapidamente e volte com o reator para dentro da incubadora. Na sequência faça a primeira injeção no cromatógrafo. Do contrário, reinjete o gás no reator e amostre-o novamente com seringa descartável, dando sequência aos demais passos.

Se houver gás suficiente, convém realizar pelo menos 3 injeções por reator. Caso não haja gás suficiente para injeção, aguarde mais tempo até a produção de gás aumentar.

Após as injeções e registro, esgote todo o excedente de gás do reator em selo hídrico.

Inicie a construção do gráfico de produção de metano versus tempo a fim de visualizar facilmente a evolução do ensaio. Para tal, utilize a equação 4 para descontar a contribuição do volume de vapor de água e converter o volume produzido de biogás para a CNTP:



$$V_0^{tr} = V \cdot \frac{(p - p_w) \cdot T_0}{p_0 \cdot T}$$

equação (4)

Onde:

V_0^{tr} = volume de biogás produzido

V = volume medido na seringa

p = pressão atmosférica do ambiente (idêntica à pressão da fase gasosa)

p_w = pressão de vapor d'água na temperatura de trabalho do teste

p_0 = pressão atmosférica na CNTP

T_0 = temperatura na CNTP

T = temperatura de trabalho do teste

Considerando 30°C como a temperatura de trabalho do teste e assumindo a máxima pressão de vapor da água, deriva-se a equação 5 a partir da equação de BURMAN & POCHOP (1994) para cálculo da pressão atmosférica em função da altitude.

$$V_0^{tr} = V \cdot [(101,3 + 0,01055 \cdot A) - 4,2467] \cdot 0,00889$$

equação (5)

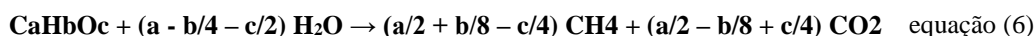
Onde:

A = cota altimétrica (m) da localidade onde o teste é conduzido.

Multiplique os volumes obtidos de biogás seco na CNTP, pela concentração de metano obtida por meio da cromatografia gasosa.

O ensaio pode ser encerrado quando a curva de metano acumulado começar a alcançar seu patamar máximo.

Se estiver usando substrato de fórmula química conhecida, verifique se ao menos 50% da produção de metano teórica foi alcançada^[4]. Se esse critério não for atendido, o ensaio deverá ser prolongado. Para essa verificação, utilize a equação 6^[19]:



Selecione períodos, com no mínimo 4 pontos, que estejam incluídos no trecho de linear da curva de produção acumulada de metano. Encontre a função da reta correspondente a cada um desses períodos, bem como seus valores de R². Para obtenção do valor de AME, divida os valores de coeficiente angular encontrados pela carga de inóculo (em STV) exposta no reator.

O valor de AME mais consistente é aquele que corresponda ao maior período selecionado, com valor de R² maior ou igual a 0,99.

● **Validação dos resultados**

Os resultados são considerados válidos se: i) a curva do gráfico de produção de metano apresentar uma forma dita 'normal' ou típica de 'degradação retardada', a depender do substrato orgânico utilizado^[10]; ii) forem utilizados pelo menos 4 pontos para definição da função de reta correspondente ao trecho linear, com valor de R² > 0,99.

● **Expressão dos resultados**

O resultado da AME deve ser expressa sempre em gás seco e na CNTP a fim de garantir a comparabilidade entre estudos.

O resultado da AME pode ser expresso em diferentes unidades, por exemplo: ml_{CH₄}/gSTV.dia; gDQO_{CH₄}/gSTV.dia; gDQO_{CH₄}/gSSV.dia; mol_{CH₄}/gSTV.dia. A partir do resultado corrigido, isto é, em gás seco e na CNTP, basta fazer as conversões de interesse considerando o coeficiente estequiométrico de oxidação do metano, qual seja: 1 ml de CH₄ na CNTP, equivale a 0,0028g de DQO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, E.F., ARAUJO, J.C. *Procedimento operacional padrão para realização do ensaio de atividade metanogênica específica (AME) de lodos anaeróbios*. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/ UFMG, 2010. 23 p.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22th ed., Washington, American Public Health Association, 2022.
3. ANGELIDAKI, I., ALVES, M., BOLZONELLA, D., BORZACCONI, L., CAMPOS, J. L., GUWY, A. J., VAN LIER, J. B. *Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays*. *Water Science and Technology*, v. 59, n. 5, p. 927–934. 2009.
4. AQUINO, S.F., CHERNICHARO, C.A.L., FORESTI, E., SANTOS, M.L.F., MONTEGGIA, L.O. *Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios*. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 2, p. 192-201, jun. 2007.
5. ASTALS, S., KOCH, K., WEINRICH, S., HAFNER, S.D., TAIT, S., PECES, M. *Impact of Storage Conditions on the Methanogenic Activity of Anaerobic Digestion Inocula*. *Water*, v. 12, n. 5, p. 1321, 2020.
6. BATSTONE, D.J., LU, Y., JENSEN, P.D. *Impact of dewatering technologies on specific methanogenic activity*. *Water Research*, v. 82, p. 78–85, 2015.
7. BURMAN, R., POCHOP, L.O. *Developments in atmospheric science, 22: evaporation, evapotranspiration and climate data*. Netherlands: Elsevier Science, p. 73-104, 1994.
8. CHERNICHARO, C.A. L. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias: reatores anaeróbios*. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016. 379 p.
9. FILER, J., DING, H.H.; CHANG, S. *Biochemical Methane Potential (BMP) Assay Method for Anaerobic Digestion Research*. *Water*, v. 11, n. 5, p. 921, 1 maio 2019.
10. HAFNER, S.D., ASTALS, S. *Systematic error in manometric measurement of biochemical methane potential: Sources and solutions*. *Waste Management*, v. 91, p. 147–155, 2019.
11. HAFNER, S.D., WEINRICH, S., ASTALS, S. *Identification of Critical Problems in Biochemical Methane Potential (BMP) Tests From Methane Production Curves*. *Frontiers in Environmental Science*, v. 7, 2019.
12. HARPER, S.R., POHLAND, F.G. *Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment*. *Biotechnol. Bioeng*, v. 28, n. 4, p. 585–602, 1986.
13. HOLLIGER, C., ALVES, M., ANDRADE, D., ANGELIDAKI, I., ASTALS, S., BAIER, U., WIERINCK, I. *Towards a standardization of biomethane potential tests*. *Water Science and Technology*, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 2016.
14. HOLLIGER, C., FRUTEAU-DE-LACLOS, H., HACK, G. *Methane Production of Full-Scale Anaerobic Digestion Plants Calculated from Substrate's Biomethane Potentials Compares Well with the One Measured On-Site*. *Front. Energy Res.*, v. 5, p. 1–9, 2017.
15. KOSTER, I.W., LETTINGA, G. *The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge*. *Agricultural Wastes*, v. 9, n. 3, p. 205–216, 1984.
16. MONTEGGIA, L.O. *Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro “Atividade Metanogênica Específica”*. In: Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, Foz do Iguaçu, 1997.

17. PARRA, A.P.O., TORRES, P.L., MARMOLEJO, L.F.R., CÁRDENAS, M.C.L., VÁSQUEZ, C.F., TORRES, W.A.L., ORDÓÑEZ, J.A.A. *Efecto de la relación sustrato-inóculo sobre el potencial bioquímico de metano de biorresiduos de origen municipal. Ingeniería, Investigación y Tecnología*, v. 16, n. 4, p. 515-526, 2015.
18. PENNA, J.A. *Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica*. 1994. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.
19. RAPOSO, F., BANKS, C.J., SIEGERT, I., HEAVEN, S., BORJA, R. *Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. Process Biochemistry*, v. 41, n. 6, 1444–1450. 2006.
20. RAY, G., NOORI, M.T., Ghangrekar, M.M. *Novel application of peptaibiotics derived from Trichoderma sp. for methanogenic suppression and enhanced power generation in microbial fuel cells. RSC Advances*, v. 7, n. 18, p. 10707–10717, 2017.
21. SOTO, M., MÉNDEZ, R., LEMA, J.M. *Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. Water Research*, v. 27, n. 8, p. 1361–1376, 1993.
22. VEREIN DEUTCHER INGENIEURE. 4630: *Fermentation of organic materials-Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests*. In.: _____ VDI Handbuch Energietechnik. Berlin: Beuth Verlag GmbH, 2006, p. 44-59.
23. WANG, B., STROMBERG, S., Li, C., NGES, I.A., NISTOR, M., DENG, L., LIU, J. *Effects of Substrate Concentration on Methane Potential and Degradation Kinetics in Batch Anaerobic Digestion. Bioresour. Technol.*, v. 194, p. 240–246, 2015.
24. WANG, B., BJORN, A., STROMBERG, S., NGES, I. A., NISTOR, M., LIU, J. *Evaluating the Influences of Mixing Strategies on the Biochemical Methane Potential Test. J. Environ. Manag.*, v. 185, p. 54–59, 2016.