

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ISOLAMENTO MICROBIANO NA
BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE
CURTUMES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Borges Agustini

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ISOLAMENTO MICROBIANO NA BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE CURTUMES

Caroline Borges Agustini

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de concentração: Pesquisa e desenvolvimento de processos.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Mariliz Gutterres

Co-orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Marisa da Costa

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Isolamento Microbiano na Biodegradação de Resíduos de Curtumes*, elaborada por Caroline Borges Agustini, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Diosnel Antonio Rodriguez López

Universidade de Santa Cruz do Sul - Departamento de Engenharia,
Arquitetura e Ciências Agrárias.

Prof^ª. Dr^ª. Gertrudes Corção

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - ICBS, PPGMAA.

Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - DEQUI, PPGEQ.

Agradecimentos

À UFRGS e ao Departamento de Engenharia Química, pela estrutura oferecida. Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos. Ao CNPq (Edital UNIVERSAL – MCTI/CNPq N° 14/2010 e N° 14/2013) e à FAPERGS (Edital 04/2012 Programa Pesquisador Gaúcho), pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, professora Mariliz Gutterres, e à minha co-orientadora, professora Marisa da Costa, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

À toda a minha família, especialmente aos meus pais, Nilcem e José Roberto, por todo amor, suporte e incentivo, desde sempre.

Ao meu bolsista, Wolmir, por toda ajuda e pela amizade.

A todos os meus amigos, em especial aos amigos do LACOURO, pelo companheirismo, ajuda e carinho.

Ao Jader, simplesmente por existir.

Resumo

Os resíduos do processo de curtumes e a crescente importância da geração de energia a partir de fontes renováveis fazem com que seja necessário estudar formas de biodegradação dos resíduos produzidos pela indústria coureira e gerar energia a partir disso. Os resíduos sólidos produzidos pelos curtumes contêm cromo e costumam ser dispostos em aterros industriais perigosos. O biogás com alto teor de metano é o produto dessa decomposição, através de digestão anaeróbia. A partir desses conceitos, esse trabalho propõe realizar ensaios de biodegradação com lodo, proveniente de uma estação de tratamento de efluentes de curtumes, e com farelo de couro *wet-blue* (couro curtido ao cromo) em biorreatores de bancada. O objetivo principal foi isolar, quantificar e identificar os microrganismos que apresentam potencial de produzir biogás com alto teor de metano. Ainda, a forma de armazenamento prévio do lodo adicionado também foi analisada. Primeiramente, incubou-se o lodo com farelo de couro *wet-blue* em biorreatores de bancada (dez ensaios de biodegradação divididos em duas montagens) e análises de quantificação e de qualificação do biogás gerado foram feitas. Depois, realizou-se a coleta de alíquotas da biomassa gerada nos biorreatores em diferentes fases do crescimento. O isolamento da biomassa coletada foi conduzido em frascos tipo penicilina com meio de cultura propício para o crescimento de arqueas metanogênicas, onde era possível a incubação em atmosfera anaeróbia. A partir dos crescimentos dos microrganismos, realizaram-se testes de contagem, isolamento, coloração de Gram, além de novos testes de coleta de biomassa dos próprios frascos. Como resultado, a influência do armazenamento prévio do lodo na biodegradação deste com farelo de couro *wet-blue* ainda não foi totalmente elucidada. Os microrganismos isolados não eram arqueas metanogênicas. Realizou-se a contagem de microrganismos, em dois ensaios de biodegradação que tiveram sua biomassa coletada. O primeiro biorreator analisado (biorreator 4) apresentou $1,90 \times 10^9$ e $4,45 \times 10^6$ UFC/mL para o sólido precipitado e para o líquido sobrenadante, respectivamente. O segundo biorreator analisado (biorreator 7) apresentou $1,35 \times 10^9$ e $1,09 \times 10^9$ UFC/mL para o sólido precipitado sem e com adição de lodo ao meio de cultivo antes da autoclavagem, respectivamente, e $9,10 \times 10^6$ e $8,30 \times 10^6$ UFC/mL para o líquido sobrenadante sem

e com adição de lodo ao meio de cultivo antes da autoclavagem, respectivamente. Foi detectado metano apenas nos frascos que continham alíquotas de biomassa provenientes dos biorreatores que estavam pouco diluídos, provenientes da coleta em fase final de produção de biogás, com quantidades elevadas de microrganismos. O percentual de metano encontrado nesses frascos variou entre 25,75 e 53,66% e foi detectado após a terceira semana de incubação. A homogeneização do lodo se mostrou um fator de grande influência na biodegradação. A técnica de isolamento com a utilização de frascos de penicilina mostrou-se adequada para a quantificação de microrganismos metanogênicos presentes nos ensaios de biodegradação, mas ainda não adequada para o isolamento das arqueas metanogênicas.

Palavras-chave: biodegradação, resíduos sólidos, biogás, isolamento microbiológico.

Abstract

The tanning process waste and the increasing importance of energy generation from renewable sources make the study of alternative biodegradation ways of the waste produced by leather industry and the generation of power from it a necessity. The solid residues produced by tanneries contain chromium and are usually disposed in hazardous industrial landfills. Biogas with high methane content is the product of this decomposition by anaerobic digestion. Based on these concepts, this study proposes to perform biodegradation tests with sludge, from a tannery effluent treatment plant, and with wet-blue (leather tanned with chromium) shavings in bench bioreactors. The main objective was to isolate, quantify and identify microorganisms with potential to produce biogas with high methane content. Further, the prior storage form of the added sludge was also analyzed. First, the sludge and the wet-blue shavings were incubated in bench bioreactors (ten biodegradation tests divided into two assemblies) and quantification and qualification analysis of the generated biogas were made. Later, biomass aliquots generated in the bioreactors were collected at different growth stages. The collected biomass isolation was conducted in penicillin type injectable vial filled with culture medium propitious for methanogenic archaea growth, where it was possible to incubate in anaerobic atmosphere. From microorganisms' growth, test of counting, depletion, Gram stain and other biomass collection of the vials themselves were carried out. As a result, the prior sludge storage influence on biodegradation tests of sludge with wet-blue shavings was not yet fully elucidated. Isolated microorganisms were not methanogenic archaea. The microorganism counting was held in two biodegradation tests with collected biomass. The first bioreactor analyzed (bioreactor 4) showed $1,90 \times 10^9$ and $4,45 \times 10^6$ CFU/mL for the precipitated solid and the supernatant liquid, respectively. The second bioreactor analyzed (bioreactor 7) showed $1,35 \times 10^9$ and $1,09 \times 10^9$ for the precipitated solid without and with added sludge in the culture medium before autoclaving, respectively, and $9,10 \times 10^6$ and $8,30 \times 10^6$ CFU/mL for the supernatant liquid without and with added sludge in the culture medium before autoclaving, respectively. Methane was only detected in vials containing collected biomass aliquots from final stages of biogas production bioreactors that were bit diluted and

had high amounts of microorganisms. The percentage of methane found in these vials ranged between 25,75 and 53,66% and was detected after three weeks of incubation. The sludge homogenization proved to be a great influence factor on biodegradation. The isolation technique with penicillin type injectable vial proved to be appropriate for methanogenic microorganisms' quantification in biodegradation tests, although it is not fully understood for the methanogenic archaea isolation.

Keywords: biodegradation, solid waste, biogas, microbiological isolation.

Sumário

Introdução	1
1.1 Objetivos e Metodologia do Trabalho.....	4
1.2 Estrutura do Trabalho	4
Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica	7
2.1 A Indústria Coureira no Brasil e os Resíduos Gerados no Processamento de Couros.....	7
2.1.1 Etapas do Processo de Curtimento e Resíduos Gerados.....	8
2.1.2 Tratamento e Destino dos Resíduos	11
2.2 Aterro de Resíduos Industriais Perigosos – ARIP.....	15
2.3 Digestão Anaeróbia	16
2.3.1 Fases da Digestão Anaeróbia.....	17
2.3.1.1 Hidrólise	19
2.3.1.2 Acidogênese.....	19
2.3.1.3 Acetogênese.....	19
2.3.1.4 Metanogênese	19
2.3.2 Fatores que Influenciam a Digestão Anaeróbia.....	20
2.3.2.1 Substrato	20
2.3.2.2 Temperatura.....	21
2.3.2.3 Umidade.....	21
2.3.2.4 pH	21
2.3.2.5 Substâncias Inibidoras	22
2.3.3 Produção de Biogás	23
2.4 Isolamento e Identificação de Microrganismos Anaeróbios	25
2.5 Arqueas Metanogênicas.....	29
2.6 Cromatografia Gasosa	32
2.7 Trabalhos de biodegradação de resíduos de curtumes e isolamento de microrganismos ambientais	33
Materiais e Métodos.....	37
3.1 Digestão dos Resíduos em Biorreatores	37
3.1.1 Composição dos Biorreatores	38
3.1.2 Quantificação dos Gases Gerados – Medidas de Volume.....	41
3.2 Coleta de Biomassa	43
3.2.1 Meio de Cultura Utilizado	43
3.2.1.1 Modificações no Meio de Cultura	45
3.2.2 Coleta de Biomassa dos Biorreatores	45
3.2.3 Isolamento em Frascos Tipo Penicilina.....	46
3.2.4 Isolamento das Arqueas Metanogênicas a partir do Crescimento nos Frascos tipo Penicilina.....	53
3.2.5 Isolamento em Placas de Petri	54
3.3 Qualificação dos Gases Gerados – Análises Cromatográficas.....	54

3.3.1	Qualificação dos Gases Gerados nos Ensaio de Biodegradação.....	54
3.3.2	Qualificação dos Gases Gerados nos Frascos Tipo Penicilina	56
3.4	Contagem e caracterização das unidades formadoras de colônias (UFC).....	57
Resultados e Discussão.....		59
4.1	Ensaio de Biodegradação	59
4.1.1	Geração de Biogás nos Biorreatores.....	60
4.1.2	Geração de Metano nos Biorreatores.....	61
4.1.3	Análise da Influência do Armazenamento Prévio do Lodo na Biodegradação	65
4.1.4	Interferência da Presença de Oxigênio na Metanogênese	66
4.2	Quantificação e Isolamento de Arqueas da Biomassa Extraída	72
4.2.1	Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)	72
4.2.2	Isolamento das Arqueas	73
4.2.3	Coloração de Gram	75
4.2.4	Geração de Metano nos Frascos de Cultivo de Arqueas	76
Conclusões		79
5.1	Conclusões e Considerações Finais.....	79
5.2	Sugestões para Trabalhos Futuros	81
Referências bibliográficas		83
Anexo I.....		91
Anexo II.....		101
Anexo III.....		109

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fluxograma da produção de couro com a indicação dos resíduos gerados em cada etapa e proposta de reaproveitamento **10**
- Figura 2.** Diagrama do processo de degradação de matéria orgânica através de digestão anaeróbia. Fonte: Li *et al.* (2011) **18**
- Figura 3.** Reações dos dois caminhos metanogênicos, a partir do acetato, já relatados. Fonte: Sasaki *et al.* (2011)..... **20**
- Figura 4.** Transição da composição do biogás em um aterro de resíduos sólidos. Fonte: Pierobon (2007) **25**
- Figura 5.** Curva de crescimento de microrganismos em meio de cultura fechado. Fonte: Doran (1997)..... **26**
- Figura 6.** Representação esquemática do princípio das reações em cadeia da técnica de PCR. Fonte: Garibyan e Avashia (2013)..... **29**
- Figura 7.** Árvore filogenética dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* e os respectivos filos. Fonte: Pace (2009) **30**
- Figura 8.** Biorreatores em escala de bancada (foto (esquerda) e esquematização (direita)) com indicação das válvulas utilizadas para a medida de volume de gás (válvula superior) e de amostras gasosas para serem analisadas por cromatografia gasosa (válvula lateral), além das duas fases que se formavam (líquido sobrenadante e sólido precipitado)..... **38**
- Figura 9.** Lodo ativado adensado coletado de uma estação de tratamento aeróbio de um curtume que utiliza sais de cromo como agente de curtimento **39**
- Figura 10.** Aparato (foto (esquerda) e esquematização (direita)) utilizado para a medição do volume total de gás gerado nos experimentos, com indicação da válvula de controle para a passagem de gás (pressão), da mangueira conectora com o biorreator de bancada além da coluna de água e da abertura do aparato para o ambiente **41**
- Figura 11.** Configuração dos biorreatores e do aparato de medição durante a medida de volume de biogás produzido no biorreator (foto (superior) e esquematização (inferior)). 1: Biorreator; 2: Válvula para o controle da passagem do gás do biorreator e mangueira acoplada; 3: Válvula de controle de entrada do gás no aparato medidor; 4: Coleta do líquido deslocado..... **42**

Figura 12. Frascos tipo penicilina de 50 mL, com tampa de borracha e lacre de alumínio, utilizados para o isolamento de microrganismos coletados dos biorreatores.....	46
Figura 13. Esquematização do experimento 1 de coleta de biomassa dos biorreatores. Coleta do sólido e do líquido, em duplicata, do biorreator 4 após 118 dias do início do experimento de biodigestão	48
Figura 14. Esquematização do experimento 2 de coleta de biomassa dos biorreatores. Coleta do sólido e do líquido do biorreator 7 após 46 dias do início do experimento de biodigestão, com adição de lodo ao meio de cultivo, antes da autoclavagem, em metade dos frascos	49
Figura 15. Esquematização do experimento 3 de coleta de biomassa dos biorreatores. Coleta do sólido do biorreator 9 após 101 dias do início do experimento de biodigestão, com adição de lodo ao meio de cultivo, antes da autoclavagem, em todos os frascos	50
Figura 16. Esquematização do experimento 4 de coleta de biomassa dos biorreatores. Coleta do sólido do biorreator 10 após 131 dias do início do experimento de biodigestão com adição de lodo e de antimicrobiano ao meio de cultivo em todos os frascos	51
Figura 17. Detalhamento das condições do experimento de isolamento da biomassa coletada dos biorreatores em frascos tipo penicilina de 50 mL: (a) inserção da solução de vitaminas (ou solução de antibiótico) no meio de cultivo; (b) capela de fluxo laminar utilizada; (c) selamento após cada perfuração realizada na tampa de borracha com parafina derretida proveniente de uma vela acesa; (d) solidificação do meio de cultivo de forma inclinada.....	52
Figura 18. Procedimento de isolamento de arqueas metanogênicas coletadas do frasco com formação de bolhas no meio de cultivo (1S11a)	53
Figura 19. Coleta de amostras dos biorreatores para análise cromatográfica. 1: Biorreator; 2: Válvula para a coleta do gás e seringa coletora.....	56
Figura 20. Volume total acumulado de biogás gerado em cada biorreator da primeira montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.....	60
Figura 21. Volume total acumulado de biogás gerado em cada biorreator da segunda montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.....	61
Figura 22. Exemplos de cromatogramas gerados, em mV x s, com amostras coletadas na segunda semana de experimento – (a) e (b) – e com amostras coletadas	

na sexta semana de experimento – (c) e (d) – do biorreator 6 (2 ^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais).....	62
Figura 23. Volume acumulado de metano (CH ₄) gerado em cada biorreator da primeira montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.....	63
Figura 24. Volume acumulado de metano (CH ₄) gerado em cada biorreator da segunda montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.....	64
Figura 25. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 1 (1 ^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais).....	66
Figura 26. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 2 (1 ^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais).....	67
Figura 27. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 3 (1 ^a montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento).....	67
Figura 28. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 4 (1 ^a montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.....	68
Figura 29. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 5 (1 ^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais e com adição de colágeno hidrolisado).....	68
Figura 30. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 6 (1 ^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais e com adição de colágeno hidrolisado).....	69
Figura 31. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 7 (2 ^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.....	69
Figura 32. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 8 (2 ^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais).....	70
Figura 33. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 9 (2 ^a montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.....	70
Figura 34. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 10 (2 ^a montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.....	71

Figura 35. Frascos com formação de UFC provenientes do primeiro experimento de coleta de alíquotas de biomassa do biorreator 4 com três semanas de cultivo com indicação das colônias que seriam plaqueadas.....	74
Figura 36. Crescimento das colônias isoladas dos frascos obtidos do primeiro experimento de coleta de alíquotas de biomassa do biorreator 4.....	74
Figura 37. Visualização microscópica do resultado da coloração de Gram realizada dos isolamentos dos cultivos dos frascos obtidos do experimento 1 de coleta de alíquotas de biomassa.....	75
Figura 38. Frascos provenientes da primeira diluição das duas coletas de alíquotas de biomassa realizadas da fase sólida precipitada – Experimento 1 de coleta – com presença de bolhas no interior do meio de cultivo.....	76
Figura 39. Frascos provenientes da segunda diluição do experimento 4 de coleta que apresentaram crescimento microbiano.....	77
Figura 40. Frasco proveniente da segunda diluição do procedimento de coleta e de isolamento de biomassa coletada do frasco 1S11a com formação de bolhas	78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Vantagens desvantagens da digestão anaeróbia. Fonte: Wiszniowski <i>et al.</i> (2006).....	17
Tabela 2. Reações para formação de metano através da metanogênese. Fonte: Whitmann <i>et al.</i> (2006).....	31
Tabela 3. Caracterização do farelo de couro wet-blue obtida por Kipper (2013).....	34
Tabela 4. Caracterização do lodo de ETE de curtume obtida por Kipper (2013).....	34
Tabela 5. Componentes do meio de cultura utilizado por Anjos <i>et al.</i> (2013).....	35
Tabela 6. Composição da solução de nutrientes adicionada aos biorreatores. Fonte: Priebe <i>et al.</i> (2013).....	39
Tabela 7. Experimentos de biodigestão de resíduos	40
Tabela 8. Composição das soluções necessárias para a preparação do meio de cultura e solução diluente para o isolamento das arqueas metanogênicas. Fonte: Whitman <i>et al.</i> (2006).....	43
Tabela 9. Descrição dos experimentos de coleta de alíquotas de biomassa dos biorreatores.....	47
Tabela 10. Condições de análises cromatográficas nas duas colunas empacotadas utilizadas. Fonte: Priebe <i>et al.</i> (2013)	55
Tabela 11. Fatores de resposta de cada gás para as colunas utilizadas nas análises cromatográficas. Fonte: Dietz (1967)	56
Tabela 12. Valores máximos e mínimos de biogás e de metano encontrados por Priebe <i>et al.</i> (2013) e por Kipper (2013) em ensaios de biodegradação com lodo proveniente de estação de tratamento de efluente de curtume e com farelo de couro <i>wet-blue</i>	65
Tabela 13. Estimativa de UFC/mL em cada fase dos biorreatores 4 e 7.....	73
Tabela 14. Percentuais de metano obtido, por análise cromatográfica com coluna Porapak Q, nos frascos provenientes da primeira diluição das duas coletas de alíquotas de biomassa da fase sólida precipitada – Experimento 1 de coleta – após 3 semanas de cultivo	77

Tabela AIII. Número de UFC nos frascos do experimento 1 e 2 de coleta de alíquotas de biomassa dos biorreatores após três semanas de incubação, com indicação dos frascos utilizados para estimativa de biomassa em cada fase do biorreator..... **110**

Lista de Abreviaturas

ARIP – Aterro de resíduos industriais perigosos

ATP – Trifosfato de adenosina

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DQO – Demanda química de oxigênio

ETE – Estação de tratamento de efluentes

GC – *Gas chromatography* (cromatografia gasosa)

NTK – Nitrogênio total Kjeldahl

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PNRS – Política Nacional dos Resíduos Sólidos

TCD – *Thermal conductivity detector* (detector de condutividade térmica)

UFC – Unidades formadoras de colônia

Capítulo 1

Introdução

O Brasil conta com mais de 700 empresas ligadas à cadeia do couro, desde organizações familiares, até curtumes médios e grandes conglomerados corporativos do setor. Esse setor emprega mais de 50 mil trabalhadores e, parte desse contingente, dedica-se exclusivamente a ações para reciclagem de águas, descarte adequado de resíduos e melhoria de processos, o que tem gerado resultados significativos nas últimas décadas (CICB, 2014). Entretanto, a sua importância econômica tem como contraponto as questões ambientais relativas ao processo de curtimento. Cada vez mais é reconhecida a importância de medidas tecnológicas capazes de combater os problemas ambientais causados pela disposição dos resíduos gerados na produção de couros, em especial os resíduos sólidos.

Sabe-se que o processamento de couro divide-se em três fases principais de processo: ribeira, curtimento e acabamento. As operações de ribeira visam limpar e preparar a pele para o curtimento. O curtimento é a operação unitária onde ocorre a estabilização do colágeno, de forma que a pele adquira resistência à degradação química, física e biológica. O acabamento confere ao couro as suas características finais, tais como firmeza, cor e maciez, dependendo, exclusivamente, da finalidade que o couro será destinado. Essas etapas geram uma gama de efluentes líquidos e resíduos sólidos.

Para cumprir as exigências ambientais, os curtumes possuem estações de tratamento de efluentes (ETE), que se dividem em etapas de tratamento preliminar, primário (ou físico químico) e secundário (ou biológico). O tratamento biológico tem uma alta reciclagem e recuperação dos resíduos. O principal subproduto do tratamento de águas residuais são os

lodos e a sua quantidade tem aumentado como consequência do aumento da quantidade de efluentes industriais tratados. Nos últimos anos, a fração orgânica dos resíduos sólidos tem sido reconhecida como um valioso recurso que pode ser convertido em produtos úteis via transformação microbiana.

Os principais resíduos sólidos produzidos pelos curtumes são serragens, aparas de couro *wet-blue*, couros acabados e semi-acabados, assim como lodos provenientes dos ciclos de caleiro, banhos de cromo, das ETEs, entre outros. Esses resíduos costumam ser dispostos em aterros de resíduos industriais perigosos (ARIPs), que são caracterizados como locais de confinamento e também de tratamento biológico não controlado de resíduos. Vale ressaltar alguns métodos alternativos desses resíduos sólidos, tais como, descromagem, couro aglomerado, incorporação de lodo em concreto, fertilizante do solo, produção de carvão ativo, reciclagem, compostagem e incineração. Esses métodos são hoje em dia muito estudados, mas mesmo a incineração ainda deixa um resíduo de 10 a 20% do volume inicial, sendo necessário ainda a destinação das cinzas geradas para aterros.

O principal processo que ocorre em aterros é a digestão anaeróbia, que consiste no crescimento de microrganismos através da degradação de compostos orgânicos e inorgânicos na ausência de oxigênio molecular. É produzido biogás como produto final desse processo, composto, principalmente, por metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), além de um resíduo orgânico remanescente rico em nitrogênio. Esse tratamento biológico é adequado para a remoção de poluentes orgânicos de resíduos, pois pode converter quase todas as formas de biomassa em biogás altamente energético, de forma que age simultaneamente no tratamento de resíduos e na produção de energia. Entre os fatores que influenciam a digestão anaeróbia, estão o tipo, disponibilidade e complexidade do substrato, temperatura, umidade, substâncias inibidoras, tais como, amônia, sulfetos e metais pesados, entre outros. Esse processo ocorre em quatro fases inter-relacionadas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Há quatro utilizações principais do biogás: produção de calor e vapor, produção e/ou cogeração de energia elétrica (principal utilização), uso como combustível de veículos e produção de produtos químicos. Os incentivos governamentais para apoiar a produção de energias renováveis representam o principal fator para impulsionar a utilização de biogás. E, considerando a segurança energética e o meio ambiente, há uma grande necessidade de se desenvolver uma fonte de energia limpa e renovável.

O biogás produzido pela digestão anaeróbia é composto principalmente por metano (CH_4), que é o principal componente que determina o seu poder calorífico, e dióxido de carbono (CO_2) além de quantidades menos significativas de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e outros compostos de enxofre e amônia (NH_3). Entretanto, a composição real do biogás varia entre diferentes locais de produção e também em um único local, devido às alterações nas condições do processo e da matéria-prima.

O poder calorífico do metano típico é de 21–24 MJ/m³. O rendimento de metano no biogás (percentual de metano produzido) é afetado por muitos fatores, incluindo tipo e composição do substrato, composição microbiana, temperatura, umidade, projeto do biorreator, entre outros. A produção volumétrica de metano é afetada pelos mesmos fatores que afetam o percentual de metano no biogás, mas também é influenciada pela quantidade de água que é adicionada ao sistema de digestão.

O conhecimento da ecologia e da função da comunidade microbiana no processo de digestão anaeróbia é necessário para controlar esse processo biológico. Dentre as técnicas conhecidas para o isolamento de microrganismos em cultura pura, as mais comumente utilizadas são as técnicas de esgotamento em placas e de diluições em tubos. Para o isolamento de microrganismos extremamente sensíveis ao oxigênio, os anaeróbios obrigatórios, que são os microrganismos de interesse, um meio de cultura previamente reduzido é necessário. Duas técnicas são majoritariamente empregadas: meios enriquecidos e meios com antibióticos. As principais técnicas para o cultivo de microrganismos anaeróbios obrigatórios são feitas em sacos de anaerobiose, jarras de anaerobiose e câmaras de anaerobiose.

Os microrganismos responsáveis pela produção de metano fazem parte do domínio *Archaea*, que é caracterizado por microrganismos procarióticos que são evolutivamente distintos dos microrganismos do domínio *Bacteria* em sua organização genômica, expressão gênica, composição celular e filogenia. As arqueas metanogênicas são um grupo caracterizado, principalmente, pela formação de metano como o principal produto de seu metabolismo energético. Os principais habitat dos metanogênicos são locais onde não exista O_2 e exista abundância de matéria orgânica.

1.1 Objetivos e Metodologia do Trabalho

O conhecimento da ecologia e da função da comunidade microbiana no processo de digestão anaeróbia é necessário para controlar esse processo biológico. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho é isolar, quantificar e identificar os microrganismos que apresentam potencial de produzir biogás com alto teor de metano a partir de ensaios de biodegradação através da incubação de lodo proveniente de aterros de curtumes com farelo de couro *wet-blue* em biorreatores de bancada para, posteriormente, associar e otimizar o tratamento desses resíduos com a produção de energia renovável. Ainda, a forma de armazenamento prévio do lodo adicionado aos ensaios de biodegradação também foi analisada.

1.2 Estrutura do Trabalho

O presente trabalho está estruturado em 5 capítulos.

No capítulo 2 será apresentada uma revisão teórica sobre a indústria coureira no Brasil, os aspectos do processamento realizado em curtumes, os resíduos gerados em cada etapa, o tratamento dos resíduos e sua destinação para aterros. Também é dada uma especial ênfase para a digestão anaeróbia e para a produção de biogás, para as técnicas de isolamento e identificação dos microrganismos de interesse, os anaeróbios, além da apresentação de trabalhos anteriores de biodegradação de resíduos de curtumes e isolamento de microrganismos ambientais.

No capítulo 3 será feita a descrição da parte experimental realizada no trabalho que aborda dois tópicos principais. O primeiro é a incubação do lodo proveniente de uma estação de tratamento de curtumes e do farelo de couro *wet-blue* em biorreatores de bancada e a descrição das técnicas de análise de quantificação e qualificação do biogás gerado neles. O segundo é a coleta da biomassa gerada nesses biorreatores e as técnicas utilizadas para o isolamento, quantificação e identificação dos microrganismos obtidos.

No capítulo 4 serão apresentados os resultados obtidos e suas discussões. Esses resultados, assim como a parte experimental, dividem-se em dois grupos. O primeiro é a geração e a caracterização do biogás gerado nos biorreatores, analisadas e comparadas com os resultados previamente descritos na literatura. O segundo são os resultados dos isolamentos feitos em frascos tipo penicilina e em placas de Petri da biomassa coletada dos biorreatores,

assim como a análise das colônias geradas, com testes de coloração de Gram, contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e análises cromatográficas para se verificar a geração de metano.

No capítulo 5 serão apresentadas as conclusões e as sugestões para futuros trabalhos.

Capítulo 2

Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é apresentada uma revisão teórica sobre a indústria coureira no Brasil, os aspectos do processamento realizado em curtumes, os resíduos gerados em cada etapa e o tratamento dos resíduos e a sua destinação para aterros. Também é dada uma especial ênfase para a digestão anaeróbia e para a produção de biogás que ocorre nos aterros com potencial para geração de energia através do poder calorífico do metano contido. Por fim, discutem-se as técnicas de isolamento e identificação dos microrganismos de interesse, os anaeróbios obrigatórios, além da apresentação de trabalhos anteriores de biodegradação de resíduos de curtumes e de isolamento de microrganismos ambientais.

2.1 A Indústria Coureira no Brasil e os Resíduos Gerados no Processamento de Couros

O setor coureiro do Brasil, de 2012 a 2014, tem processado cerca de 44,5 milhões de peles por ano. Possui 310 plantas curtidoras, 2.800 indústrias de componentes para couro e calçados e 120 fábricas de máquinas de equipamentos. Esse setor gera 42.100 empregos diretos e movimentou US\$ 3,5 bilhões a cada ano. Além da sua grande importância na economia, essa indústria também tem como matéria-prima um subproduto da indústria frigorífica, a pele animal. O Brasil é dono do maior rebanho bovino comercial do mundo, com 206 milhões de cabeças de corte (14,23% do rebanho bovino mundial) (CICB, 2014). Entretanto, a importância econômica dessa indústria tem como contraponto as questões ambientais relativas aos resíduos gerados no processo de curtimento, tanto na forma de efluentes líquidos como na forma de resíduos sólidos (PICCIN, 2013).

Embora se encontrem na literatura (ZUPANČIČ e JEMEC, 2010) muitos trabalhos sobre o tratamento de efluentes líquidos de curtumes, o tratamento de resíduos sólidos, que também são gerados pelo próprio tratamento de efluentes líquidos, em especial pela via anaeróbia, tem recebido menos atenção nos últimos anos.

A implementação de tecnologias mais limpas no processamento de couro reduz consideravelmente a poluição gerada nos curtumes. No entanto, essas são mais focadas nos efluentes do processo, de forma que os resíduos sólidos são, normalmente, dispostos em aterros, devido à baixa biodegradabilidade do couro curtido (DHAYALAN *et al.*, 2007). Dessa forma, cada vez mais é reconhecida a importância de medidas tecnológicas capazes de minimizar os problemas ambientais causados pela disposição dos resíduos gerados na produção de couros, em especial dos resíduos sólidos (ZUPANČIČ e JEMEC, 2010).

2.1.1 Etapas do Processo de Curtimento e Resíduos Gerados

O processo de produção realizado em curtumes consiste em transformar a pele, natural ou salgada, em couro. Sua tecnologia de fabricação requer diversas etapas, com adições sequenciais de produtos químicos, intercaladas por lavagens e processos mecânicos (PASSOS, 2007). O processamento divide-se em três fases principais: ribeira, curtimento e acabamento (DETTMER, 2012).

As operações de ribeira visam limpar e preparar a pele para o curtimento. As principais operações dessa etapa são:

- Remolho: limpa e reidrata a pele, interrompendo a sua conservação de modo que ela volte ao estado de pele fresca;
- Depilação/caleiro: realizada, principalmente, para retirar o pelo, remover a epiderme e intumescer e separar as fibras e fibrilas de colágeno por meio do inchamento pela absorção de água;
- Descarne: elimina os materiais aderidos ao carnal (tecido subcutâneo e adiposo), em máquina de descarnar, de forma a facilitar a penetração de produtos químicos aplicados em etapas posteriores;
- Divisão: divide a pele em duas camadas: superior (flor) e inferior (raspa);

- Desencalagem: elimina a cal presente na pele;
- Purga: limpa a pele e restos de epiderme, pelo e gordura;
- Píquel: prepara as fibras de colágeno para uma fácil penetração do agente curtente.

Após as operações de ribeira, a pele apresenta-se preparada para receber o agente curtente. O curtimento é a operação unitária em que os agentes de curtimento reagem com a matriz da pele, estabilizando o colágeno, de forma que a pele adquira resistência à degradação química, física e biológica. O processo de curtimento é realizado em duas etapas: difusão e fixação do curtente (AQUIM, 2009). O agente curtente bloqueia os grupamentos amina ou carboxílicos do colágeno juntando-se à proteína e formando ligações cruzadas (*cross linking*) entre as fibras de colágeno (EL-SHEIKH *et al.*, 2011).

Devido à grande variedade de couros, são muitos os tipos possíveis de curtimento existentes, sendo o curtimento ao cromo o mais utilizado, que utiliza sulfato básico de cromo como agente curtidor, que é um dos produtos químicos com maior impacto ambiental da indústria coureira (PASSOS, 2007). Outros agentes de curtimento também muito usados são compostos de taninos vegetais (DHAYALAN *et al.*, 2007).

O acabamento consiste em três etapas com várias operações: acabamento molhado, pré-acabamento e acabamento. Essas conferem ao couro as suas características finais, tais como firmeza, cor e maciez, dependendo, exclusivamente, da finalidade a qual o couro será destinado (DETTMER, 2012). Uma esquematização do processo em curtumes com os resíduos gerados em cada etapa é mostrada na Figura 1.

Os resíduos gerados por esse processamento podem ser divididos em: resíduos de colágeno não curtido, resíduos de colágeno curtido e resíduos não proteicos (DETTMER, 2012). Os resíduos gerados são altamente concentrados, principalmente, em cromo, cloretos e cálcio e, por isso, são tóxicos (MELLA, 2013). O seu nível de toxicidade pode ser expresso em termos de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos totais e nitrogênio total Kjeldahl (NTK), além de enxofre, fósforo e cromo (EL-SHEIKH *et al.*, 2011).

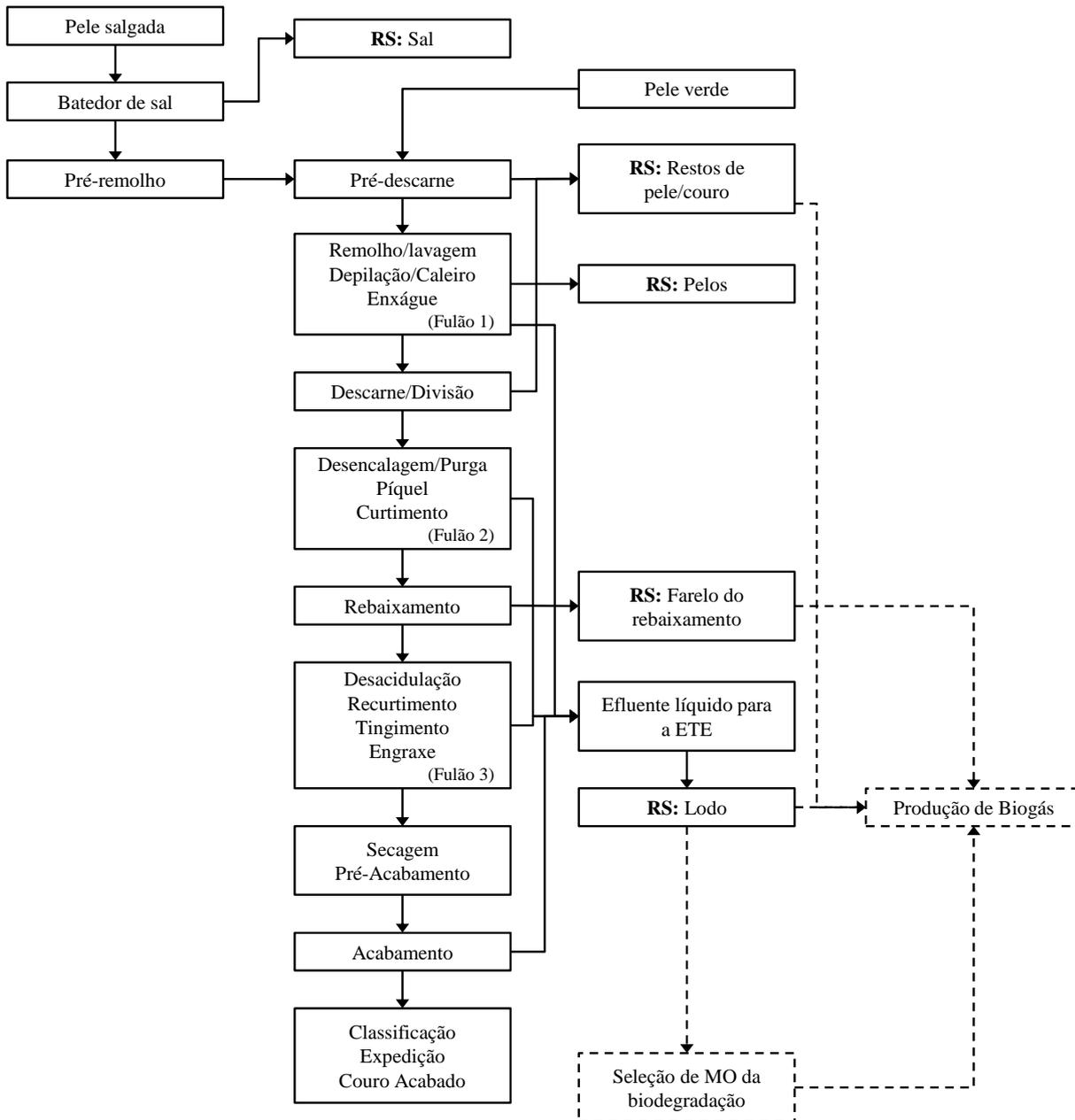


Figura 1. Fluxograma da produção de couro com a indicação dos resíduos gerados em cada etapa e proposta de reaproveitamento.

Fonte: o próprio autor.

Os principais resíduos sólidos produzidos pelos curtumes são serragens, aparas de couro *wet-blue* (couro curtido ao cromo), couros acabados e semi-acabados, assim como lodos provenientes dos ciclos de calreiro, banhos de cromo, das estações de tratamento de efluentes (ETEs), entre outros. O farelo de couro *wet-blue* é gerado no processo de ajuste de

espessura na operação de rebaixamento em máquina de rebaixar e é composto por matéria orgânica proteica que, mesmo tendo sido estabilizada pelo curtimento com sais de cromo, mostra-se passível de biodegradação. Esses resíduos costumam ser dispostos em aterros de resíduos industriais perigosos (ARIPs). Com relação à toxicidade desses resíduos, as aparas e a serragem de couros provenientes de couros curtidos ao cromo e os lodos provenientes do tratamento de efluentes líquidos originados no processo de curtimento de couros curtidos ao cromo têm como constituinte o cromo trivalente, configurando, assim, a sua toxicidade (KIPPER, 2013).

2.1.2 Tratamento e Destino dos Resíduos

Entre os motivos pelos quais surge a necessidade de tratar os resíduos pode-se citar a escassez de áreas para a destinação final dos resíduos, a disputa pelo uso de áreas remanescentes, a valorização dos componentes dos resíduos como forma de promover a conservação de recursos e a necessidade de inertização de resíduos. Os processos de tratamento alteram as características, a composição e as propriedades dos resíduos, com o objetivo de reduzir sua toxicidade, seu volume ou destruí-lo (MISSIAGGIA, 2002).

Os principais objetivos que um tratamento de resíduos eficaz deve alcançar são: diminuir o teor de água, transformar a matéria orgânica altamente putrescível em um resíduo orgânico ou inorgânico estável e/ou inerte e condicionar o resíduo para atender as regulamentações vigentes (APPELS *et al.*, 2008). Por exemplo, a Política Nacional dos Resíduos Sólidos (PNRS) (BRASIL, Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010, 2010) dispõe sobre as diretrizes relativas à gestão integrada e ao gerenciamento de resíduos sólidos, incluídos os perigosos, as responsabilidades dos geradores e do poder público e os instrumentos econômicos aplicáveis. As tecnologias para o tratamento de resíduos podem ser divididas em métodos biológicos e métodos físico-químicos. No entanto, para os padrões de poluição estabelecidos atualmente, uma combinação de padrões biológicos, químicos e físicos é necessária (WISZNIOWSKI *et al.*, 2006).

Para cumprir as exigências ambientais, os curtumes possuem ETEs. Normalmente, as etapas de tratamento nas ETEs dividem-se em tratamento preliminar, tratamento primário (ou físico químico) e tratamento secundário (ou biológico). Também podem ter tratamento terciário (ou de polimento), porém é menos comum (AQUIM, 2009).

O tratamento preliminar tem o objetivo de reduzir o teor de sólidos e de gorduras através da utilização, principalmente, das etapas de gradeamento e de caixa de gordura, respectivamente. A etapa de gradeamento tem por objetivo reduzir o teor de sólidos e, para tanto, utiliza grades com diferentes dimensões e espaçamentos. Nela os materiais grosseiros são separados do efluente, pois, por sua natureza ou tamanho, criariam problemas como desgaste de bombas ou obstruções em tubulações nas etapas posteriores. A caixa de gordura remove óleos e graxas e evita o entupimento dos orifícios. As características de uma caixa de gordura dependem da localização da ETE e do tipo e da quantidade de efluente a ser tratada (AQUIM, 2009).

O tratamento primário é normalmente composto das seguintes etapas: precipitação do cromo (banhos de curtimento passam por um tanque a fim de que o cromo com cal hidratada precipite e seja recolhido), homogeneização (mistura dos diversos banhos), neutralização (ajuste do pH), coagulação, floculação e decantação primária (AQUIM, 2009).

O tratamento secundário objetiva a remoção de matéria orgânica e de alguns nutrientes. De uma forma geral, nele são removidos os compostos biodegradáveis. Depende de alguns fatores físico-químicos do meio, tais como temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido, que são diretamente responsáveis pelo desenvolvimento dos microrganismos no sistema, além da presença de outros compostos que podem atuar como inibidores. A lagoa aerada, ou lodo ativado, é constituída basicamente por um tanque provido de sistema de aeração que funciona como um reator biológico, seguido de um decantador secundário e de uma bomba que faz o reciclo parcial do lodo biológico para a lagoa com a função de aumentar a massa microbiana. Os microrganismos nutrem-se, reproduzem-se e movimentam-se com a energia obtida através da matéria orgânica na presença de aeração. Nesta etapa também é realizada uma última decantação, onde a parte líquida é lançada ao corpo receptor e parte da fase sólida decantada, formadora do lodo, é bombeada novamente para o tanque de lodo ativado e o excesso encaminhado à centrífuga (AQUIM, 2009).

O princípio básico dos lodos ativados consiste de uma comunidade de microrganismos, em um reator, constantemente alimentada de matéria orgânica e fluxo de oxigênio. Esses microrganismos, através de seu metabolismo aeróbio, consomem a matéria orgânica presente, transformando-a em biomassa microbiana, dióxido de carbono, água e minerais. Essa comunidade microbiana é composta por uma associação de bactérias, leveduras, fungos, entre outros, que cresce através da entrada constante de resíduos (matéria

orgânica) e da interação uma com a outra (WISZNIOWSKI *et al.*, 2006). O oxigênio normalmente vem das bolhas de ar injetado, através de aeradores mecânicos com difusores (GUTTERRES e MELLA, 2015).

A utilização do tratamento terciário em curtumes, na prática, não é muito comum. No entanto, existem diversos estudos sobre a aplicação de tratamentos complementares às operações realizadas, visando à remoção de poluentes específicos que eventualmente não tenham atingido os padrões de emissão do efluente e/ou o aumento da eficiência dos processos utilizados no tratamento de efluentes.

O tratamento biológico tem uma alta reciclagem e recuperação dos resíduos (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2000). O principal subproduto desse tratamento são os lodos residuais descartados como excesso de lodo do sistema. A quantidade de lodo tem aumentado como consequência do aumento da quantidade de efluentes industriais tratados (ATHANASOULIA *et al.*, 2012). Nos últimos anos, a fração orgânica dos resíduos sólidos tem sido reconhecida com um valioso recurso que pode ser convertido em produtos úteis via transformação microbiana. A remoção de resíduos sólidos orgânicos tornou-se um problema ecológico em evidência devido ao aumento da preocupação com a saúde pública e à consciência ambiental (KHALID *et al.*, 2011). A disposição final de lodos é um problema de crescente importância e pode representar até 50% dos custos operacionais de uma ETE (APPELS *et al.*, 2008).

Os métodos convencionais de tratamento de resíduos supracitados, tais como aeração, coagulação, floculação e decantação, são dispendiosos devido ao alto investimento inicial na aquisição dos equipamentos, à grande quantidade de energia requerida e ao frequente uso de produtos químicos adicionais. Há outros métodos, tais como, osmose reversa e adsorção por carvão ativado ou com adsorventes alternativos (PICCIN *et al.*, 2012). Processos oxidativos avançados têm sido propostos como uma alternativa eficaz para a mineralização de compostos orgânicos recalcitrantes, no entanto, quando se trabalha em grande escala, essa técnica ainda não é economicamente viável (WISZNIOWSKI *et al.*, 2006).

Métodos alternativos de tratamento, tais como, reciclagem, compostagem e incineração são hoje em dia muito estudados, mas mesmo a incineração ainda deixa um resíduo de 10 a 20% do volume inicial, sendo necessária ainda a destinação desse para aterros (WISZNIOWSKI *et al.*, 2006). Alguns outros métodos que também são estudados para o

tratamento de resíduos sólidos de curtumes são descromagem química e enzimática, utilização como adsorventes para remoção de corantes em meio aquoso, incineração, gaseificação, utilização das cinzas obtidas, incorporação para produção de materiais cerâmicos, artefatos cimentícios para construção civil, entre outros (KIPPER, 2013).

O alto teor de cromo nos resíduos de curtumes que utilizam sais de cromo na etapa de curtimento impede o uso direto dos resíduos como componente de fertilizantes (ZUPANČIČ e JEMEC, 2010). Entretanto, está sendo aplicada uma tecnologia onde os resíduos de couro curtido são hidrolisados em reatores, num ambiente controlado, com alta temperatura e alta pressão, promovendo sua transformação em gelatina. Em seguida, a gelatina formada é seca, estabilizada e peneirada, obtendo-se assim adubos orgânicos com diferentes granulometrias. O processo não utiliza produtos químicos e atende todas as exigências ambientais, porém, esse adubo não é utilizado no Brasil devido às legislações que não permitem a utilização de fertilizantes contendo cromo, sendo, dessa forma, exportado, principalmente, para a Itália (KIPPER, 2013).

Antes de tratar da disposição final dos resíduos sólidos é necessário avaliar a possibilidade de minimização das quantidades geradas através de modificações nos processos produtivos, segregação, reciclagem e em seguida, aproveitamento do resíduo por outros segmentos industriais. Dessa forma, as pesquisas nessa área têm buscado alternativas para a utilização de diversos resíduos do processamento de couro, como, por exemplo: produção de recurtentes e pigmentos, produção de diversos compostos (cromato de sódio das cinzas dos resíduos de couro através de tratamento térmico, carvão ativado, oleína a partir de resíduos de descarte do couro obtenção de óleos combustíveis, hidrolisado proteico para uso no recurtimento, obtenção de gases de pirólise e energia de resíduos de curtime, borracha de butadieno de acrilonitrilo, recuperação de fibras de colágeno, gelatina, pigmentos para cerâmicas, entre outras) (PICCIN, 2013).

Entretanto, a maior parte dos resíduos sólidos gerados pelos curtumes, principalmente o farelo de rebaixamento e os lodos provenientes das ETEs, acaba sendo destinada a ARIPs. Esses aterros acabam se esgotando rapidamente, sendo necessária a criação de novos, o que ocupa significativo espaço de terra. Os resíduos sólidos da indústria coureira comprometem o ambiente, principalmente, pelo alto tempo para degradação, inutilizando o solo por várias gerações, e pela concentração de cromo no solo e nos lençóis freáticos (KIPPER, 2013).

2.2 Aterro de Resíduos Industriais Perigosos – ARIP

A disposição final de resíduos sólidos em aterros é considerada uma técnica segura e eficiente, pois permite controle do processo e apresenta uma boa relação custo-benefício. O aterro é caracterizado como um local de confinamento e também de tratamento biológico não controlado de resíduos. Existem, basicamente, três tipos de aterros: aterros sanitários, controlados e industriais, que diferem entre si no seu sistema de coleta e tratamento do chorume gerado, assim como na drenagem e queima de biogás (KIPPER, 2013).

Aterros industriais permitem a disposição controlada de resíduos perigosos no solo, sem causar danos à saúde pública, garantindo proteção ao meio ambiente. Entre as principais técnicas utilizadas para garantir esses quesitos estão o confinamento em menores áreas e volumes, através de geomembranas, a drenagem de percolados e gases, o tratamento de efluentes e a implantação de poços de monitoramento do lençol freático (PINTO, 2011).

Um aspecto importante dos aterros é que eles são sistemas abertos. Diferentes tipos de barreiras podem ser utilizados em volta do aterro, mas nenhuma possui duração indeterminada. A construção de uma célula para resíduos perigosos deve ter uma cobertura temporária removível. Estas células devem possuir uma barreira composta de dupla impermeabilização, que utiliza simultaneamente materiais naturais (argila) e materiais artificiais (manta de polietileno de alta densidade) e um sistema de dupla drenagem, formado por dreno testemunho e dreno de captação (MISSIAGGIA, 2002).

O monitoramento desse tipo de aterro deve ser permanente, a fim de prevenir a contaminação do solo e das águas subterrâneas. Deve-se também procurar reduzir a quantidade de material lixiviado emitido pelo aterro, evitando-se a disposição de resíduos muito úmidos e pastosos. De uma forma geral, os resíduos dispostos em aterros devem ser secos, estáveis, pouco solúveis, não voláteis e, principalmente, devem ser compatíveis, de forma que não reajam entre si ou com águas infiltradas. Não devem ser: ácidos, bases fortes, compostos orgânicos muito solúveis e voláteis, orgânico-persistentes, materiais inflamáveis, oleosos e explosivos e resíduos radioativos (SILVA, 2011). A vida útil de um aterro depende do volume de material que recebe, do tempo e da densidade aparente do material (TOCCHETTO e SOARES, 2003).

A Portaria n° 016/2010, de 20 de abril de 2010, dispõe sobre o controle da disposição final de resíduos Classe I com características de inflamabilidade no solo, em sistemas de

destinação final de resíduos denominados “aterro de resíduos classe I” e “central de recebimento e destinação de resíduos classe I”, no âmbito do Estado do Rio Grande do Sul.

2.3 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia é uma tecnologia bioquímica que consiste no crescimento de microrganismos através da degradação de compostos orgânicos e inorgânicos na ausência de oxigênio molecular (LASTELLA *et al.*, 2002). Nesse processo são produzidos, principalmente, metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) – biogás – como produto final, além de um resíduo orgânico remanescente rico em nitrogênio (WISZNIOWSKI *et al.*, 2006).

Esse processo é realizado por uma população de diferentes microrganismos inter-relacionados por sequências de reações biológicas dependentes que requerem condições ambientais específicas (DONOSO-BRAVO *et al.*, 2011). Esses microrganismos desempenham um papel preponderante na degradação e determinam, dessa forma, a eficiência do tratamento (DANG *et al.*, 2013). Dentre os mais relatados, estão os microrganismos heterotróficos e os clostrídios. Não é comum um tratamento biológico contar apenas com uma única espécie microbiana. Geralmente um consórcio microbiano é responsável pelo processo de digestão anaeróbia (KHALID *et al.*, 2011).

O tratamento biológico anaeróbio é adequado para a remoção de poluentes orgânicos de resíduos (NARIHIRO e SEKIGUCHI, 2007), pois pode converter quase todas as formas de biomassa, inclusive resíduos orgânicos tóxicos, tais como o chorume, em biogás altamente energético, de forma que age simultaneamente no tratamento de resíduos e na produção de energia (MEESTER *et al.*, 2012). Além disso, é uma fonte de energia renovável, uma vez que reduz os impactos ambientais, incluindo as emissões de CO₂ (HJORTH *et al.*, 2011).

Os processos anaeróbios apresentam um bom desempenho com altas cargas orgânicas, com um baixo custo operacional além da produção de biogás, e, além disso, deixam uma quantidade menor de lodo para posterior disposição em aterros (DANG *et al.*, 2013). Dentre os principais benefícios desse tratamento estão a sua rentabilidade e baixa carga poluidora (BISWAS *et al.*, 2006). De uma forma geral, é considerado uma opção sustentável para gestão de resíduos porque produz energia renovável e recicla nutrientes (LIU *et al.*, 2012). As principais vantagens e desvantagens desse processo são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Vantagens desvantagens da digestão anaeróbia.

Vantagens	Desvantagens
Alta eficiência na remoção de DBO	Metais pesados podem dificultar a digestão
Baixa quantidade de Fósforo (P) necessária como fator de crescimento	Suscetível a mudanças de temperatura e de pH
Baixa produção de lodo excedente	Alta toxicidade da amônia
Produção de biogás	Grande quantidade de amônia remanescente

Fonte: Wiszniowski *et al.* (2006).

O tratamento anaeróbio não é tão difundido como o processo aeróbio, devido, principalmente, ao maior tempo necessário para alcançar a bioestabilização e ao seu desempenho moderado. Entretanto, com relação ao processo aeróbio, a digestão anaeróbia apresenta algumas vantagens, tais como menor custo, devido a menor necessidade de energia para sua operação, menor *footprint* (quantidade de recursos naturais utilizados para viabilizar sua operação) e menor produção de biomassa remanescente (CARRÈRE *et al.*, 2010). Diferentemente do tratamento aeróbio, a digestão anaeróbia permite a recuperação de energia, em forma de metano, e produz um resíduo (lodo remanescente) que pode ser aplicado na agricultura como fertilizante de solo, desde que siga as diretrizes do Ministério da Agricultura e seja primeiramente inertizado, devido à sua reologia (propriedades físicas que influenciam o transporte de quantidade de movimento num fluido) e composição elementar favoráveis, promovendo, assim, a sustentabilidade desse tratamento (GUŠTIN e MARINŠEK-LOGAR, 2011).

A ampla aplicabilidade e a relativamente simples instalação da operação de digestão anaeróbia em reator fechado é uma alternativa para a utilização dessa tecnologia no tratamento de resíduos, produção de energia e impedimento da liberação de metano para a atmosfera. Ainda, com a sua utilização como suprimento energético, tem-se a vantagem adicional de não depender de combustíveis fósseis (MEESTER *et al.*, 2012).

2.3.1 Fases da Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia de matéria orgânica é um processo complexo que envolve uma série de diferentes etapas de degradação. Os microrganismos que participam desse processo são específicos para cada passo da degradação e, portanto, têm diferentes necessidades nutricionais (KHALID *et al.*, 2011).

Esse processo ocorre em quatro fases inter-relacionadas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, onde as principais reações que ocorrem entre cada uma das etapas são mostradas na Figura 2. As fases conectam-se devido aos produtos das diferentes atividades microbianas, envolvidas em uma determinada etapa, servirem como substrato para a etapa seguinte (ADU-GYAMFI *et al.*, 2012).

Geralmente, a maior parte do material orgânico solúvel no meio é convertida em ácidos orgânicos voláteis através da acidogênese e é transformada em biogás através da metanogênese (LI *et al.*, 2011). Para garantir a eficiência do processo, é necessário equilibrar as taxas de degradação da hidrólise com a acidogênese, assim como da acetogênese com a metanogênese, pois um desequilíbrio nessas etapas causa acumulação de ácidos orgânicos e redução na capacidade de tamponamento do sistema, resultando na redução da taxa de produção de metano (ADU-GYAMFI *et al.*, 2012).

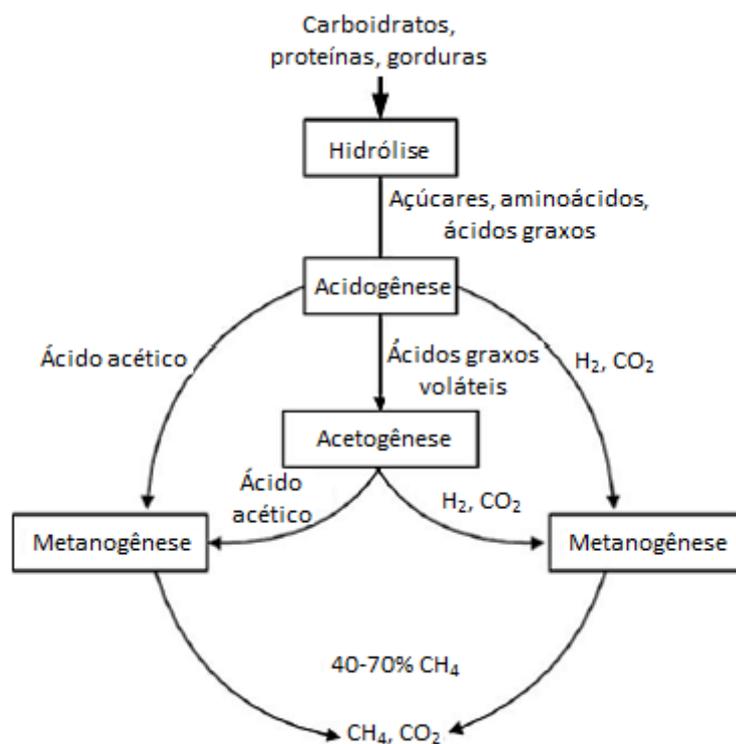


Figura 2. Diagrama do processo de degradação de matéria orgânica através de digestão anaeróbia.

Fonte: Li *et al.* (2011).

2.3.1.1 Hidrólise

No início do processo, através de enzimas extracelulares, ocorre a redução de polímeros orgânicos complexos em moléculas solúveis mais simples. As bactérias hidrolíticas reduzem compostos complexos em substratos monoméricos e diméricos solúveis. Proteínas, lipídeos e carboidratos são hidrolisados em aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa e açúcares, respectivamente (LI *et al.*, 2011).

A hidrólise do material orgânico tem sido documentada como a etapa limitante da velocidade de processos anaeróbios de digestão de resíduos com um elevado teor de sólidos (KHALID *et al.*, 2011). A hidrólise determina, portanto, a eficiência da conversão da matéria-prima em biomassa (LI *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Acidogênese

Na acidogênese, os produtos da hidrólise são convertidos em uma mistura de ácidos graxos voláteis de cadeia curta, que serão convertidos posteriormente pela acetogênese a ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono, principalmente, e que serão substratos diretos da metanogênese. Do ponto de vista termodinâmico, a acidogênese é a etapa menos favorecida energeticamente, pois o tempo de geração é baixo e as taxas de crescimento são altas (MEESTER *et al.*, 2012).

2.3.1.3 Acetogênese

Diferentes bactérias, chamadas de acetogênicas, degradam os ácidos graxos de cadeia longa produzindo ácido acético, hidrogênio molecular e CO₂ (LASTELLA *et al.*, 2002). As bactérias anaeróbias facultativas, mediante essas reações, consomem o oxigênio residual, promovendo, assim, condições adequadas para a etapa final, a metanogênese (BOND e TEMPLETON, 2011).

2.3.1.4 Metanogênese

A última etapa da degradação/transformação da matéria orgânica é a metanogênese, onde uma variedade de arqueas metanogênicas consome o acetato, o dióxido de carbono e o hidrogênio para produzir metano (LI *et al.*, 2011). Ela é particularmente sensível devido a algumas características dos metanogênicos, tais como, taxas de crescimento específicas relativamente baixas o que os torna maus competidores (ADU-GYAMFI *et al.*, 2012).

As arqueas que formam metano diferem em termos de fisiologia, necessidades nutricionais, cinética de crescimento e sensibilidade às condições ambientais dos microrganismos que formam ácido (CHEN *et al.*, 2008).

Segundo Sasaki *et al.* (2011), dois caminhos metanogênicos, a partir do acetato, têm sido relatados. Um é a metanogênese direta realizada por arqueas metanogênicas acetoclásticas, que convertem os grupos metílicos e carboxílicos de acetato para CH₄ e CO₂, respectivamente. O outro é a oxidação não acetoclástica, ou seja, ocorre através do co-metabolismo de bactérias oxidantes de acetato e metanogênicas hidrogenotróficas. Durante essa última via, o acetato é primeiro oxidado a CO₂ e, em seguida, o CO₂ produzido é reduzido a CH₄. O processo de decomposição do acetato é afetado pela temperatura, quantidade e composição das substâncias orgânicas, entre outros. Essas reações são mostradas na Figura 3.

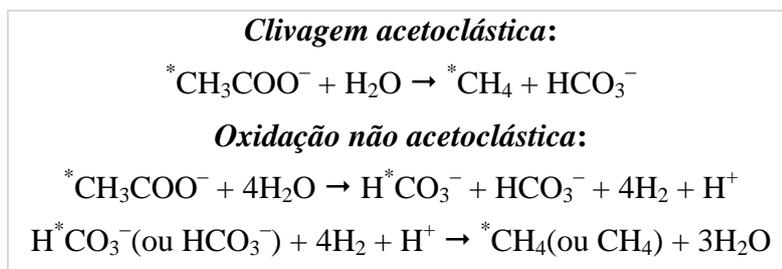


Figura 3. Reações dos dois caminhos metanogênicos, a partir do acetato, já relatados.

Fonte: Sasaki *et al.* (2011).

2.3.2 Fatores que Influenciam a Digestão Anaeróbia

Os principais fatores que influenciam a digestão anaeróbia são a disponibilidade e a complexidade do substrato, a faixa de temperatura em que as reações ocorrem, a umidade (que influencia a dissolução da matéria orgânica), o pH (que influencia a atividade enzimática) e a presença de substâncias inibidoras.

2.3.2.1 Substrato

A taxa de digestão anaeróbia é fortemente afetada pelo tipo, disponibilidade e complexidade do substrato. Para cada fonte de carbono há um diferente grupo de microrganismos com capacidade de degradá-la. A concentração inicial e o teor de sólidos totais no substrato têm influência significativa no desempenho do processo e na quantidade de metano que será produzida (KHALID *et al.*, 2011).

A relação entre carbono e nitrogênio (C/N) no material orgânico desempenha um papel crucial na digestão anaeróbia. Os nutrientes balanceados são considerados como um importante fator limitante na digestão anaeróbia de resíduos orgânicos. A relação C/N ideal está na faixa de 20-35 (KHALID *et al.*, 2011).

2.3.2.2 Temperatura

Em temperaturas mais baixas de processo, o crescimento microbiano, as taxas de utilização do substrato e a produção de biogás diminuem. Além disso, também pode haver esgotamento de energia, evasão de substâncias intracelulares ou lise completa da célula. Em contraste, altas temperaturas diminuem o rendimento de biogás devido à produção de gases voláteis, tais como amônia, que suprimem e até inibem as atividades metanogênicas (KHALID *et al.*, 2011).

Esse processo normalmente é conduzido em uma só etapa em condições mesófilas (30-40°C) ou termófilas (50-55°C). Em comparação com a digestão mesófila, a digestão termófila tem benefícios, tais como, alto grau de estabilização dos resíduos, destruição mais efetiva de patógenos virais e bacterianos e melhor desidratação do lodo remanescente (CHEN *et al.*, 2008). Ao contrário do processo mesófilo, o processo termófilo é caracterizado por um número limitado de espécies metanogênicas acetoclásticas e estrutura mais simples da comunidade microbiana (SASAKI *et al.*, 2011). Entretanto, a condição mais comumente adotada é a mesófila, pois é mais estável e requer menor gasto de energia (ATHANASOULIA *et al.*, 2012). Para a biodegradação, a temperatura deve ser inferior a 65°C, pois acima dessa temperatura ocorre a desnaturação das enzimas. Em geral, a faixa de temperatura entre 35-37°C é considerada adequada para a produção de metano (KHALID *et al.*, 2011).

2.3.2.3 Umidade

Um alto teor de umidade geralmente facilita a digestão anaeróbia, através da dissolução da matéria orgânica. No entanto, é difícil, operacionalmente, manter a mesma disponibilidade de água durante todo o ciclo de digestão (KHALID *et al.*, 2011).

2.3.2.4 pH

Em meio ácido, a atividade enzimática das arqueas é nula. Num meio alcalino, a fermentação produz anidrido sulfuroso e hidrogênio. A digestão pode se efetuar entre os pH

6,2 e 7,6, encontrando-se um valor ótimo em 7. Em aterros sanitários o pH não cai abaixo de 6,2, enquanto o metano está sendo gerado (PIEROBON, 2007).

2.3.2.5 Substâncias Inibidoras

A digestão anaeróbia é aplicável para uma ampla gama de materiais, incluindo resíduos urbanos, agrícolas, industriais e vegetais (KHALID *et al.*, 2011). Entretanto, dependendo de sua origem, o resíduo pode conter substâncias inibidoras e até mesmo tóxicas para a digestão anaeróbia, tais como amônia, sulfetos, metais pesados e alguns compostos orgânicos, como, por exemplo, alifáticos halogenados e compostos aromáticos (CHEN *et al.*, 2008).

O processo é menos eficiente para degradar compostos fenólicos e polifenólicos de baixo peso molecular tais como taninos e lipídios. Esses exercem efeitos inibidores sobre os microrganismos envolvidos. Alguns métodos de pré-tratamento vêm sendo estudados para diminuir a toxicidade desses compostos, sendo que o que apresenta os melhores resultados é o próprio tratamento biológico, com a inserção de microrganismos com a capacidade de degradar esses compostos fenólicos na comunidade microbiana (DHAYALAN *et al.*, 2007).

O nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e é necessário, principalmente, como nutriente para os microrganismos da digestão anaeróbia. Compostos nitrogenados nos resíduos orgânicos são normalmente proteínas, que são convertidas a amônio pela digestão anaeróbia. Sob a forma de amônio, o nitrogênio contribui para a estabilização do pH no decorrer do processo. Os microrganismos assimilam o amônio para o crescimento. A proporção de nutrientes dos elementos C:N:P:S de 600:15:5:3 é considerada suficiente para a metanogênese. Entretanto, um resíduo com alto teor de nitrogênio resulta em uma alta concentração de amônia durante e após a digestão. Isso pode conduzir à inibição da metanogênese e pode ser o fator mais importante para uma digestão anaeróbia eficaz. Em condições anaeróbias, o nitrogênio permanece na forma de íon amônio (NH_4^+) e sua concentração não é reduzida durante o processo. A produção de hidrogênio e a remoção de sólidos voláteis também são afetadas (KHALID *et al.*, 2011). Esse nitrogênio presente no lodo remanescente da digestão pode ser removido biologicamente através dos processos de nitrificação e desnitrificação (GUŠTIN e MARINŠEK-LOGAR, 2011).

Existem alguns compostos em resíduos, tais como metais, que se apresentam como toxinas inorgânicas, e alguns compostos orgânicos recalcitrantes (muitas vezes tóxicos), que

não são degradados e, portanto, tornar-se-ão concentrados no resíduo remanescente (KHALID *et al.*, 2011). Ainda, substâncias orgânicas fortemente lignificadas, tais como a madeira, não são adequadas para a digestão (MEESTER *et al.*, 2012).

Os metais pesados podem produzir vários efeitos, resultados da ação sobre moléculas e células. Além disso, a presença de um metal pesado pode limitar a absorção de outros nutrientes essenciais à atividade do organismo. Os metais pesados, não podendo ser metabolizados, permanecem no organismo e exercem seus efeitos tóxicos, combinando-se com um ou mais grupos reativos (ligantes), os quais são indispensáveis para as funções fisiológicas normais (ANDREOLI *et al.*, 2001).

2.3.3 Produção de Biogás

O biogás substitui combustíveis fósseis, por isso a sua utilização vem acompanhada de uma redução das emissões de gases do efeito estufa e de óxidos de nitrogênio (RASI *et al.*, 2011). Por esse motivo, o setor de energia tem cada vez mais reconhecido o biogás produzido a partir de fontes anaeróbias como uma importante fonte de energia limpa (ADU-GYAMFI *et al.*, 2012). Atualmente, o biogás produzido através da digestão anaeróbia de biomassa é pouco explorado, de forma que o rendimento de metano ainda pode ser melhorado (HJORTH *et al.*, 2011).

Mais leve do que o ar atmosférico, contrariamente a outros gases como o butano e o propano, o biogás rico em metano apresenta menores riscos de explosão na medida em que a sua acumulação ao nível do solo se torna mais difícil. A sua baixa densidade implica, em contrapartida, que ele ocupe um volume significativamente maior e que a sua liquefação só seja possível a temperaturas muito baixas, o que lhe confere algumas desvantagens em termos de transporte e utilização (PIEROBON, 2007).

O biogás produzido pela digestão anaeróbia é composto principalmente por metano (CH₄) (entre 48 e 65%) e dióxido de carbono (CO₂) (entre 36 e 41%) e por quantidades menos significativas de sulfeto de hidrogênio (H₂S), outros compostos de enxofre e amônia (NH₃). Ocasionalmente, também são encontradas quantidades pequenas de hidrogênio (H₂), nitrogênio (N₂), hidrocarbonetos saturados ou halogenados e oxigênio (O₂). Geralmente, o gás é saturado de vapor d'água e pode conter partículas de poeira e compostos orgânicos de silício. Em alguns locais de produção, também pode conter siloxanos e compostos orgânicos voláteis aromáticos e halogenados (KHALID *et al.*, 2011). Entretanto, a composição real do

biogás varia entre diferentes locais de produção e também em um único local, devido às alterações nas condições do processo e da matéria-prima (RASI *et al.*, 2011).

A comparação entre outras fontes energéticas e o biogás é feita através da determinação do poder calorífico. O poder calorífico de um combustível é a quantidade de calor liberada quando uma queima completa é realizada. Entende-se por queima completa o processo de oxidação total por unidade de massa. Havendo hidrogênio no combustível, existirá a formação de água como um dos produtos da combustão. Define-se por poder calorífico superior quando essa água resulta sob a forma de vapor e poder calorífico inferior quando se apresenta na forma líquida (PIEROBON, 2007). O poder calorífico do biogás é determinado, principalmente, pelo seu teor de metano (BACIOCCHI *et al.*, 2012), que tem um poder calorífico típico de 21-24 MJ/m³ ou em torno de 6 KWh/m³ (BOND e TEMPLETON, 2011).

O rendimento de metano no biogás (percentual de metano produzido) é afetado por muitos fatores, incluindo o tipo e a composição do substrato, a composição microbiana, temperatura, umidade, projeto do biorreator, entre outros fatores (KHALID *et al.*, 2011). A produção volumétrica de metano é afetada pelos mesmos fatores que afetam o percentual de metano no biogás, mas também é influenciada pela quantidade de água que é adicionada ao sistema de digestão. Tanto a produção volumétrica de metano quanto o percentual de metano no biogás dependem do tipo de sólidos voláteis presentes na matéria-prima a ser degradada (MØLLER *et al.*, 2004). A composição do resíduo determina o rendimento de biogás e a qualidade do gás (percentual de metano) de diferentes maneiras: a ordem para a maior produção de biogás, em volume é: lipídeos > carboidratos > proteínas, enquanto a ordem para a maior produção de metano é: lipídeos > proteínas > carboidratos (QIAO *et al.*, 2011).

O tempo necessário para a produção significativa de metano é, em geral, de um a dois anos após a disposição no aterro. O aterro como um todo normalmente sobrepõe pelo menos duas, quando não todas, as fases biológicas simultaneamente. A Figura 4 apresenta as curvas de transição da composição do biogás de um aterro sanitário em relação ao tempo entre o confinamento e a produção estável de metano. A escala de tempo corresponde a uma média, podendo variar dependendo de diversos fatores, tais como composição dos resíduos, quantidade de água disponível e temperatura ambiente. O nitrogênio e o sulfeto de hidrogênio também são produzidos, porém, em pequenas quantidades (PIEROBON, 2007).

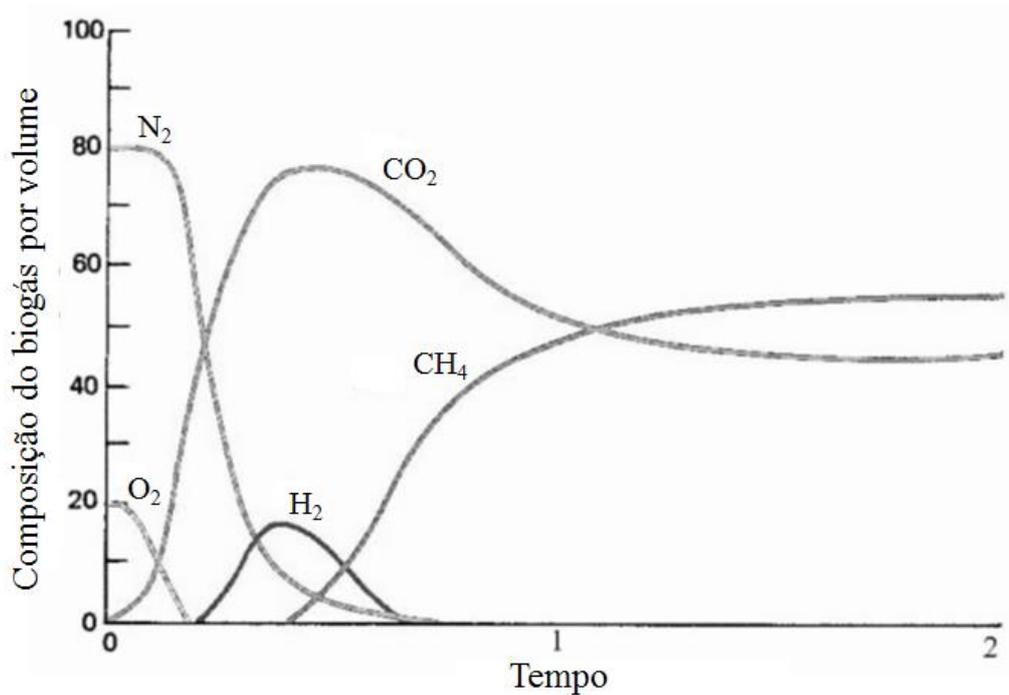


Figura 4. Transição da composição do biogás em um aterro de resíduos sólidos.

Fonte: Pierobon (2007).

2.4 Isolamento e Identificação de Microrganismos Anaeróbios

O conhecimento da ecologia e da função da comunidade microbiana no processo de digestão anaeróbia é necessário para o controle desse processo biológico. Nos ambientes naturais, os microrganismos encontram-se, quase sempre, sob forma de populações mistas. Assim sendo, para que seja possível estudar as características das espécies que compõem estas misturas, é necessário fazer seu isolamento em cultura pura. Para isso, necessita-se de um meio de cultura e de condições de incubação que facilitem o crescimento do microrganismo desejado (NARIHIRO e SEKIGUCHI, 2007).

Todos os microrganismos necessitam de uma fonte de energia para seu crescimento, que pode ser química (seres quimiotróficos) ou luminosa (seres fototróficos). Além disso, os fatores necessários para o crescimento microbiano podem ser divididos em duas categorias principais: os fatores físicos, tais como temperatura, pH e pressão osmótica, e os fatores químicos. Dentre os fatores químicos, estão a água e as diversas fontes de carbono (C), de nitrogênio (N), de fósforo (P), de enxofre (S) e de sais minerais, além dos chamados fatores de crescimento, para o caso dos microrganismos mais exigentes (COELHO *et al.*, 2006).

Quando um microrganismo é inoculado em um meio de cultura em sistema fechado, ele apresenta uma curva de crescimento característica. Essa curva, normalmente, tem quatro fases: lag (adaptação), exponencial, estacionária e de morte, mostradas na Figura 5 (LIU *et al.*, 1995). Na fase lag, a taxa de crescimento dos microrganismos é nula, pois as células estão se adaptando ao novo meio de cultura, sintetizando novas enzimas ou componentes estruturais. Na fase exponencial, a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração celular. Na fase estacionária, a concentração máxima de células foi atingida no meio de cultivo e esta concentração é constante, pois há um balanço entre a velocidade de reprodução e a velocidade de morte dos microrganismos. Na fase de morte, a concentração celular diminui, pois as células começam a perder viabilidade devido à falta de nutrientes (DORAN, 1997).

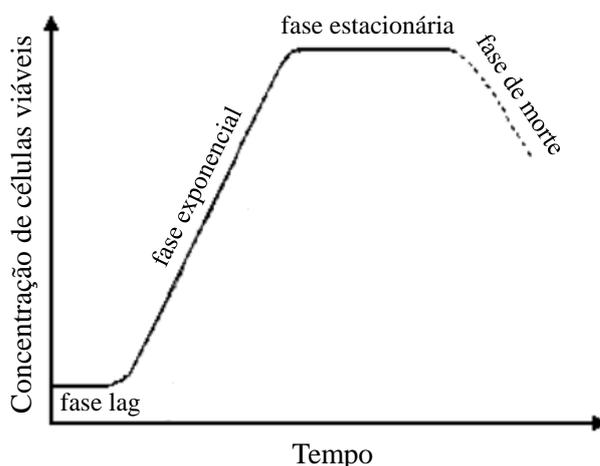


Figura 5. Curva de crescimento de microrganismos em meio de cultura fechado.

Fonte: Doran (1997).

Dentre as técnicas conhecidas para o isolamento de microrganismos em cultura pura, as mais comumente utilizadas são as técnicas do esgotamento em placas e de diluições em tubos. Ambas baseiam-se no princípio de que uma célula microbiana isolada, quando depositada em meio de cultura sólido adequado dará origem a um agrupamento macroscopicamente visível, chamado colônia. Assim sendo, a colônia é um conjunto de células idênticas que tem como origem uma única célula ou esporo (COELHO *et al.*, 2006).

Os microrganismos podem ser classificados quanto ao requerimento de oxigênio. Os aeróbios obrigatórios necessitam do oxigênio, pois ele participa do seu metabolismo como acceptor final de elétrons. Os anaeróbios facultativos sobrevivem na presença ou na ausência

de oxigênio. Para os anaeróbios obrigatórios o oxigênio é tóxico. Os anaeróbios aerotolerantes são anaeróbios que conseguem se desenvolver na presença de oxigênio, sem utilizá-lo. Os microaerófilos precisam de pressões inferiores de oxigênio (10-15%) para se desenvolver (STEPHEN e FLICKINGER, 1999).

Para o isolamento de microrganismos extremamente sensíveis ao oxigênio, os anaeróbios obrigatórios, um meio de cultura previamente reduzido é necessário. Dois tipos de meio são majoritariamente empregados: meios enriquecidos e com e sem antibióticos. Meios enriquecidos são meios preparados para favorecer a multiplicação dos microrganismos de interesse quando esses estão presentes em pequeno número em relação à microbiota de acompanhamento ou quando esses são maus competidores. Alguns destes meios são chamados de meios de enriquecimento seletivo, pois, além de propiciarem o desenvolvimento do microrganismo de interesse, inibem total ou parcialmente a microbiota de acompanhamento. Os antimicrobianos podem ser empregados como inibidores seletivos de bactérias, uma vez que nos metanogênicos, muitos dos seus sistemas enzimáticos não são afetados pela maioria dos antimicrobianos (WHITMANN *et al.*, 2006).

As principais técnicas para o cultivo de organismos anaeróbios obrigatórios são feitas em sacos de anaerobiose, jarras de anaerobiose e câmaras de anaerobiose. A técnica de sacos de anaerobiose consiste em um saco transparente e não permeável a gases. É um método muito econômico e difundido para o cultivo de microrganismos anaeróbios. Esse método permite a observação fácil da placa sem perturbar o ambiente anaeróbio. Jarras de anaerobiose são utilizadas principalmente com meios em placas. Para a sua manipulação, é exigido uma substituição adequada do ambiente oxigenado para uma atmosfera anaeróbia. Essa é a metodologia para cultura anaeróbia mais utilizada em laboratórios. Desde um saco plástico flexível até armários rígidos que estancam a passagem de gás podem ser usados como câmaras de anaerobiose. A câmara anaeróbica fornece uma atmosfera anaeróbia em larga escala. Entretanto, os avanços na tentativa de se cultivar microrganismos anaeróbios vieram com o método de Hungate (1967), também conhecido como método do *roll-tube*. A partir disso, modificações foram feitas por cada grupo de pesquisadores, dependendo das suas necessidades específicas (SINGH e MAZUMDER, 2010).

Para a caracterização de comunidades metanogênicas, utilizam-se, principalmente, métodos moleculares independentes de cultivo (KAMPMANN *et al.*, 2012). Com o desenvolvimento da tecnologia molecular de Reação em cadeia da polimerase (Polymerase

Chain Reaction – PCR) foi possível acelerar as técnicas de identificação de microrganismos. Várias espécies de metanogênicos não cultiváveis foram identificadas e caracterizadas a nível molecular (SINGH e MAZUMDER, 2010).

A técnica de PCR consiste em um ensaio enzimático que permite a amplificação de um fragmento de DNA específico a partir de um grupo complexo de DNA obtido de um ambiente ou cultivo microbiano. Cada ensaio de PCR requer a matriz de DNA, oligonucleotídeos iniciadores, nucleotídeos e a DNA polimerase. A DNA polimerase é a principal enzima que liga os nucleotídeos individuais em conjuntos para formar o produto do PCR. Os nucleotídeos são as quatro bases: adenina, timina, citosina e guanina (A, T, C e G). Os oligonucleotídeos iniciadores especificam o fragmento exato de DNA a ser amplificado de um microrganismo específico. Eles são pequenos fragmentos de nucleotídeos, com uma sequência de DNA complementar ao fragmento alvo do gene que deve ser detectado e amplificado (GARIBYAN e AVASHIA, 2013).

Os componentes referidos são misturados, nas quantidades adequadas, definidas experimentalmente para cada sistema de interesse, e colocados em um termociclador que permite a amplificação do DNA através de ciclos repetidos de temperatura que ocorrem em três etapas básicas. O primeiro passo é a desnaturação, onde a solução é aquecida acima de seu ponto de fusão, o que faz com que as duas cadeias de DNA complementares se separem. Em seguida, ocorre a hibridização ou anelamento, onde a redução da temperatura permite que os oligonucleotídeos iniciadores se liguem ao segmento de DNA alvo. E por fim, ocorre a duplicação, onde a temperatura é elevada novamente, permitindo que a enzima DNA polimerase prolongue a cadeia formada pelos oligonucleotídeos iniciadores através da adição de nucleotídeos. A cada repetição dessas três etapas, o número de moléculas de DNA copiadas duplica (GARIBYAN e AVASHIA, 2013). Uma esquematização dessas três etapas é mostrada na Figura 6.

Existem dois métodos principais de visualização dos produtos de PCR: a coloração do produto de DNA amplificado com um corante químico, tal como o brometo de etídio, que se intercala entre as duas cadeias do DNA, e a marcação dos oligonucleotídeos iniciadores ou dos nucleotídeos com algum corante fluorescente antes da amplificação. Tipicamente, quando o PCR é utilizado para detectar presença ou ausência de um produto de DNA específico, é chamado de PCR qualitativo. Essa técnica é utilizada para fins de clonagem e identificação de um gene específico (GARIBYAN e AVASHIA, 2013).

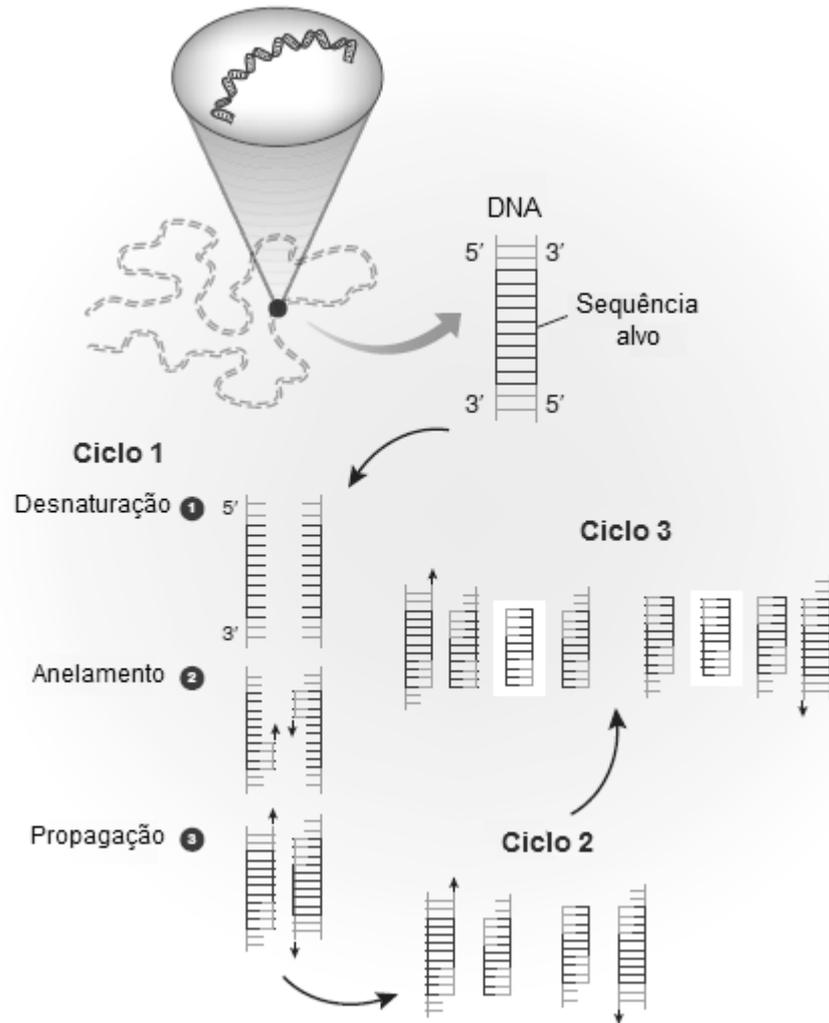


Figura 6. Representação esquemática do princípio das reações em cadeia da técnica de PCR.

Fonte: Garibyan e Avashia (2013).

Em muitos estudos sobre comunidades metanogênicas em digestores anaeróbios, se utilizaram oligonucleotídeos detectando a sequência genética 16S rRNA de todas as arqueas ou de alguma metanogênica especial. Outra possibilidade é a utilização de oligonucleotídeos que se ligam ao gene *mcrA* que codifica uma subunidade da metil-coenzima A reductase. Esta enzima catalisa a última etapa da reação de metanogênese e é encontrada apenas em metanogênicas e é, portanto, utilizada para PCRs específicos (KAMPMANN *et al.*, 2012).

2.5 Arqueas Metanogênicas

O domínio *Archaea* é caracterizado por microrganismos procarióticos que são evolutivamente distintos dos microrganismos do domínio *Bacteria* em sua organização genômica, expressão gênica, composição celular e filogenia. A árvore filogenética dos três domínios é mostrada na Figura 7. As primeiras *Archaeas* foram isoladas de ambientes

inóspitos, caracterizados pela ausência de oxigênio molecular, elevadas temperaturas (cerca de 100°C), acidez (cerca de pH 2,0) e salinidade (10–15%). Por muitos anos acreditou-se que as *Archaeas* viviam exclusivamente nesses ambientes, no entanto, estudos recentes têm mostrado que elas são muito diversificadas e mais amplamente distribuídas do que se pensava (PAZINATO *et al.*, 2010).

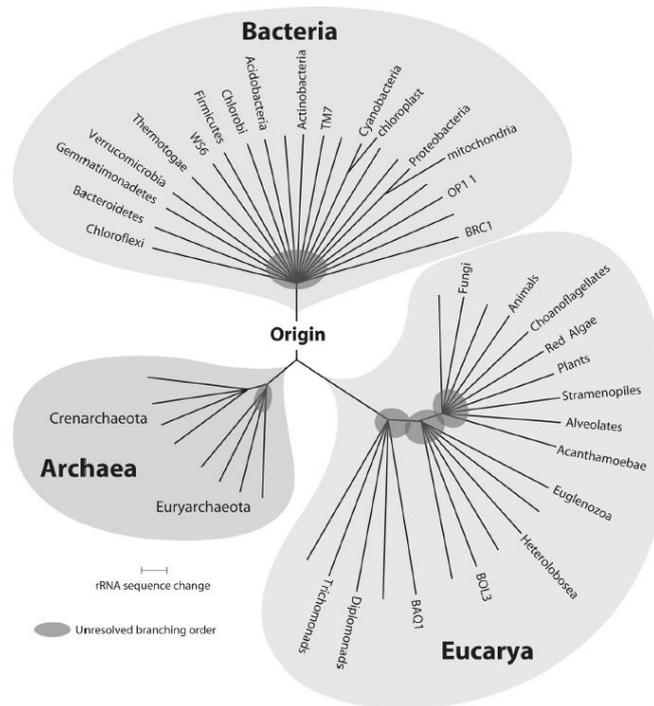


Figura 7. Árvore filogenética dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* e os respectivos filos.

Fonte: Pace (2009).

O domínio *Archaea* apresenta cinco filos: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thaumarchaeota* e *Aigarchaeota*. A maioria das *Archaeas* cultivadas são extremófilas, com espécies capazes de crescer em altas temperaturas e salinidades e em pH extremos (BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2011).

O ramo *Euryarchaeota* contém três grupos de organismos que exibem fisiologias distintas, os metanogênicos, os halófilos extremos e os termoacidófilos. Os halófilos extremos e os termoacidófilos crescem nos extremos superior ou inferior de pH e requerem O₂, enquanto para os metanogênicos ele é letal. Os metanogênicos, como *Methanobacterium*, são anaeróbios estritos. Seu metabolismo é único, uma vez que a energia é obtida durante a produção de metano. Os metanogênicos são organismos importantes na degradação anaeróbia

de matéria orgânica na natureza, sendo a maior parte do metano encontrado na Terra resultado do seu metabolismo (BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2011).

Os metanogênicos são um grupo caracterizado, principalmente, pela formação de metano como o principal produto de seu metabolismo energético e por ser formado por arqueas anaeróbias estritas. Eles exigem uma série de vitaminas, minerais e fontes de enxofre que são bastante específicas. No entanto, não são rigorosos com relação à fonte de carbono (PAZINATO *et al.*, 2010). Eles obtêm energia para seu crescimento a partir da conversão de um número limitado de substratos para o gás metano. As reações possíveis para a conversão de metano através da metanogênese são mostradas na Tabela 2. Esses substratos não incluem compostos comuns como glicose e ácidos orgânicos ou graxos (exceto acetato de piruvato). Compostos como a glicose podem ser convertidos em metano somente em reações em que há cooperação de metanogênicos e outras bactérias anaeróbias. Empregando-se a mistura correta de organismos, virtualmente qualquer composto orgânico, até mesmo hidrocarbonetos, pode ser convertido em metano e dióxido de carbono (WHITMANN *et al.*, 2006).

Tabela 2. Reações para formação de metano através da metanogênese.

Reação
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
$4 \text{ Formato} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$4 \text{ 2-Propanol} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{ Acetona} + 2\text{H}_2\text{O}$
$2 \text{ Etanol} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ Acetato}$
$\text{Metanol} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$
$4 \text{ Metanol} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
$4 \text{ Metilamina} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4^+$
$2 \text{ Dimetilamina} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ NH}_4^+$
$4 \text{ Trimetilamina} + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{ CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 4 \text{ NH}_4^+$
$2 \text{ Dimetilsulfeto} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$
$\text{Acetato} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$

Fonte: Whitmann *et al.* (2006).

Os principais habitat dos metanogênicos são locais onde não exista O_2 . Uma vez que são anaeróbios estritos, seus habitat naturais são biotas anóxicas, tais como solos, sedimentos e aparelhos gastrointestinal de animais (KAMPMANN *et al.*, 2012). Em culturas axênicas (não contaminadas com nenhum outro microrganismo), os metanogênicos são extremamente

sensíveis a pequenas quantidades de O₂. No entanto, em habitat naturais oxigenados, a atividade de outros microrganismos protege os metanogênicos do O₂ (WHITMANN *et al.*, 2006).

2.6 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é um método de separação muito difundido, robusto e flexível. Ela separa substâncias com base na sua diferença de velocidade de migração em um sistema bifásico. É amplamente utilizada devido a sua capacidade de separar componentes de misturas complexas e, ao mesmo tempo, produzir informações quantitativas sobre cada um (CORTES *et al.*, 2009).

No processo de cromatografia gasosa, uma película fina de uma fase estacionária (camada microscópica de líquido ou polímero sobre um sólido inerte) fica confinada em uma coluna que é continuamente varrida pela fase móvel, um gás de arraste. As principais vantagens da cromatografia gasosa são: a sensibilidade e a seletividade, que podem ser variadas de acordo com a aplicação, um pequeno volume de amostra é requerido e repetidas medidas podem ser feitas em pequenos intervalos de tempo (THOMPSON e STEPHEN, 1985). É uma técnica que só pode ser aplicada a materiais que podem ser vaporizados, não sendo útil para análise de proteínas ou de metais (JENNINGS *et al.*, 1997).

A coluna é a única parte do sistema GC (*gas chromatography*) que separa fisicamente os componentes. Há dois tipos de colunas nesse processo: colunas empacotadas e colunas tubulares (DORMAN *et al.*, 2010). As colunas empacotadas têm, tipicamente, 2-5 m de comprimento, 1-5 mm de diâmetro interno e são cheias com um suporte granular “inerte” onde cada partícula é revestida com a fase estacionária. A coluna, que no sistema GC possui uma das extremidades ligada à entrada do cromatógrafo e a outra ligada ao detector, é ajustada para uma temperatura adequada e é continuamente varrida pela fase móvel (gás de arraste). Quando uma mistura de componentes voláteis é introduzida no injetor, na entrada da coluna, cada um dos componentes da amostra interage com a fase móvel e a fase estacionária em um equilíbrio altamente dinâmico particionando-se na coluna de acordo com a sua constante de distribuição (JENNINGS *et al.*, 1997).

Como a separação depende da partição de cada componente entre as duas fases, a temperatura da coluna é um fator crítico para a análise. Se a temperatura da coluna estiver muito baixa, os componentes permanecem em grande parte na fase estacionária e dificilmente

entram na fase móvel, de forma que não serão detectados na saída da coluna. Em contrapartida, se a temperatura estiver muito alta, os componentes permanecem em grande parte na fase móvel e dificilmente entram em contato com a fase estacionária, de modo que serão detectados como uma mistura não separada (JENNINGS *et al.*, 1997).

2.7 Trabalhos de biodegradação de resíduos de curtumes e isolamento de microrganismos ambientais

Dhayalan *et al.* (2007) abordaram a biodegradabilidade de couros não curtidos, couros curtidos com cromo e couros curtidos com taninos vegetais. Em seus experimentos, eles variaram a fonte de microrganismos anaeróbios, provindas de duas fontes diferentes, lodo anaeróbio e cepas isoladas a partir do lodo, e verificaram a influência de um pré-tratamento de descurtimento da pele, com a utilização de ácido oxálico. Encontraram que couros curtidos com tanino vegetal produzem mais biogás do que couros curtidos com cromo. As cepas com os microrganismos isolados produziram mais gás na degradação dos couros curtidos com tanino vegetal, quando comparados com a degradação desses mesmos couros com lodo. Entretanto, no couro curtido com cromo, não houve diferença significativa da origem microbiana. Verificaram também que o descurtimento tende a aumentar a produção de biogás nos dois tipos de couro curtidos analisados.

Zupančič e Jemec (2009) investigaram a digestão anaeróbia de diferentes tipos de resíduos de curtumes, tais como aparas de peles, lodos e águas residuais. Dentre os seus principais resultados, encontraram que o potencial bioquímico de metano é o mesmo para 37°C e 55°C e que o início da produção de biogás se dá a partir do centésimo dia de incubação. Também encontraram que os altos teores de cromo e sal não provocam efeitos adversos na digestão anaeróbia.

Trabalhos realizados no LACOURO (UFRGS) por Kipper (2013), Priebe *et al.* (2013) e Anjos *et al.* (2013) vêm buscando o aprimoramento da biodegradação dos resíduos sólidos de curtumes através da digestão anaeróbia de lodos provenientes de diferentes ETEs.

Kipper (2013) avaliou a produção de biogás por resíduos de curtumes (farelo de rebaixamento e lodo biológico de uma ETE de curtume), o efeito do tratamento enzimático do farelo de rebaixamento para acelerar sua decomposição e aumentar a produção de biogás através de ensaios de biodegradação em biorreatores de bancada. Também realizou um

levantamento das condições (construção e operação) de ARIPs localizados nas proximidades de Porto Alegre. Entre os seus resultados, vale destacar o pré-tratamento enzimático térmico para hidrólise de colágeno que resultou em um aumento de 78,3% na produção de biogás e de 76,5% de metano em relação ao colágeno não tratado. O autor obteve a caracterização do farelo de couro *wet-blue* (Tabela 3) e do lodo adensado adicionado (Tabela 4).

Tabela 3. Caracterização do farelo de couro *wet-blue* obtida por Kipper (2013).

Análise	Percentual
Matéria Volátil	41,39%
Teor de Cinzas (base seca)	9,51%
Teor de Óxido de Cromo (base seca)	3,94%
Nitrogênio NTK (base seca)	8,90 %
Teor de Proteína	55,6%

Tabela 4. Caracterização do lodo de ETE de curtume obtida por Kipper (2013).

Análise	Resultado
Sólidos Suspensos Totais	29,17 g.L ⁻¹
Sólidos Suspensos Voláteis	18,95 g.L ⁻¹
Teor de Óxido de Cromo (base seca)	7,67 %
Nitrogênio NTK	245,56 mg.L ⁻¹

Priebe *et al.* (2013) analisaram o potencial de produção de biogás por diferentes substratos contendo colágeno, incluindo resíduos de curtumes, em escala de bancada, em condições controladas e testaram diferentes lodos, provenientes de esgoto doméstico, curtumes e frigoríficos. Entre os seus resultados, observaram uma dificuldade da biota em degradar resíduos contendo cromo. Encontraram que uma pré-adaptação dos inóculos ao cromo, presente naqueles provenientes de ETEs de curtumes, mostrou um maior desempenho na produção de biogás.

Anjos *et al.* (2013) isolaram os microrganismos com potencial para produzir metano de ensaios de biodegradação de lodo proveniente de ETEs de curtume com colágeno hidrolisado e couro *wet-blue*. Os autores utilizaram o meio de cultura descrito na Tabela 5 e realizaram coloração de Gram dos isolamentos obtidos. A maioria dos 24 resultados que obtiveram para a coloração de Gram foi bastonetes Gram-positivos esporulados.

Tabela 5. Componentes do meio de cultura utilizado por Anjos *et al.* (2013).

Componentes	Concentração (g/L)
Ágar	15
NaCl	10
Extrato de levedura	7
Peptona	10
Colágeno hidrolisado	4
Leite desnatado	10

Andrioli e Gutterres (2014) estudaram alternativas para o tratamento ou reaproveitamento dos resíduos sólidos de curtumes. Abordaram o co-processamento, onde os resíduos são utilizados como matéria-prima ou fonte de energia para substituir os recursos naturais e os combustíveis fósseis; a gaseificação, processo no qual é gerado gás combustível ou gás de síntese; e, no caso de resíduos sólidos orgânicos, a compostagem, objetivando a produção de um composto fertilizante como alternativas ao tratamento dos resíduos sólidos gerados pela indústria coureiro-calçadista.

Shanmugam e Horan (2009) estudaram a otimização da co-digestão de resíduos de curtumes com resíduos sólidos municipais através da variação da proporção C/N e do pH para minimizar a amônia e maximizar o rendimento de biogás. As melhores condições encontradas foram com uma proporção C/N de 15 e pH de 6,5. Além disso, a geração de biogás aumentou de 560 mL usando somente resíduos de curtumes para 6.518 mL utilizando uma mistura otimizada. No pH de 8,5, o aumento de amônia coincidiu com o baixo rendimento de biogás, confirmando a toxicidade da amônia. Em contraste, no pH de 4,5, a amônia foi mínima, mas os ácidos graxos voláteis foram elevados, inibindo a atividade metanogênica. A atividade da biomassa, medida usando trifosfato de adenosina (ATP), se correlacionou com a produção de biogás.

Thangamani *et al.* (2010) mostraram que os resíduos de curtumes, incluindo os lodos gerados em ETEs, contêm quantidades significativas de sólidos voláteis passíveis de biodegradação. Submeteram diferentes proporções de resíduos e de lodos à digestão anaeróbia em um reator em escala de bancada. Encontraram que a degradação de 41 a 52% dos sólidos voláteis presentes no resíduo resultou na produção de biogás com 71 a 77% de metano.

Kameswari *et al.* (2011) estudaram a co-digestão de lodos gerados em diferentes etapas no tratamento de efluentes de curtumes cujo desempenho foi avaliado através da geração de biogás. Uma lipase comercial foi adicionada para melhorar a hidrólise em doses que variaram de 0,25 a 1 g a cada 7,5 g de sólidos voláteis. Encontraram que a dosagem ótima da lipase utilizada era cerca de 0,75 g, onde a geração de biogás teve um aumento de 15% em relação ao controle sem adição de lipase. Além disso, o tempo da digestão com a adição de lipase foi 30% mais rápido, o que leva a uma diminuição de custo operacional.

López *et al.* (2004) isolaram novos microrganismos para a depleção de inibidores em hidrolisados de ácido lignocelulósico. Uma estratégia de enriquecimento sequencial foi utilizada para isolar microrganismos a partir do sólido. A seleção dos microrganismos foi realizada em um meio de minerais. Posteriormente, com base nos crescimentos, isolaram cinco bactérias e um fungo, que foram úteis no desenvolvimento de bioprocessos para reduzir a inibição na conversão de biomassa lignocelulósica para combustíveis e produtos químicos.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo, é feita a descrição da parte experimental realizada no trabalho que aborda dois tópicos principais. O primeiro é a incubação de resíduos de curtumes (lodo do tratamento biológico de efluente de uma estação de tratamento de curtumes juntamente com farelo de couro *wet-blue*) mediante adição de meio apropriado e descrição das técnicas de análise de quantificação e de qualificação do biogás gerado. O segundo é a coleta da biomassa gerada nesses biorreatores e as técnicas utilizadas para o isolamento e identificação dos microrganismos nela obtidos.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), no Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da UFRGS e no Laboratório de Bacteriologia, no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS.

3.1 Digestão dos Resíduos em Biorreatores

Para se avaliar o potencial de produção de metano devido à biodigestão dos resíduos pelos microrganismos de interesse, conduziu-se seu cultivo em biorreatores de bancada. Esses biorreatores eram feitos de vidro, com volume útil de 350 mL e foram mantidos em um banho termostático a 35°C. Eles possuíam duas válvulas de abertura: uma superior, utilizada para a medida de volume de gás produzido, e uma lateral, utilizada para a retirada de amostras para análise cromatográfica, como mostrado na Figura 8.

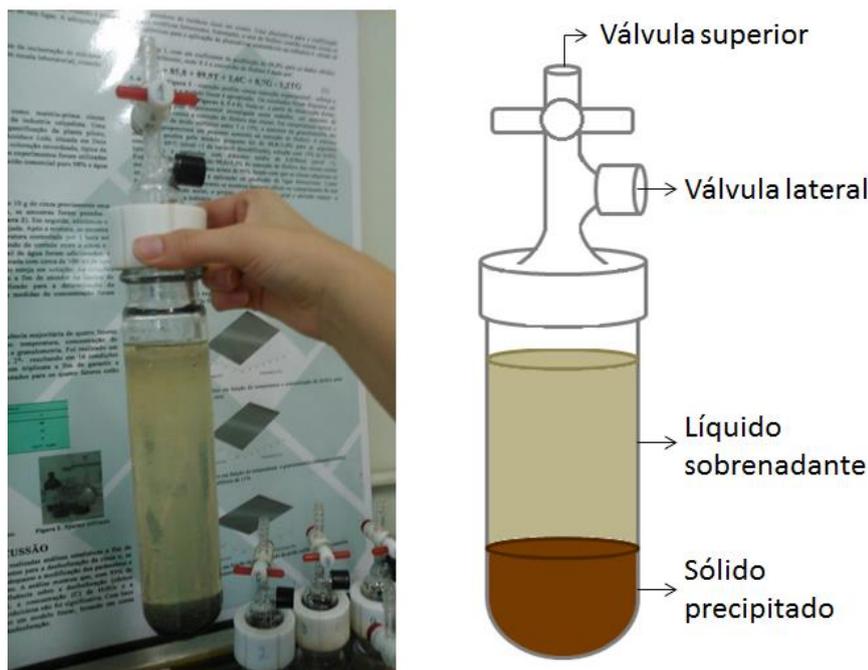


Figura 8. Biorreatores em escala de bancada (foto (esquerda) e esquematização (direita)) com indicação das válvulas utilizadas para a medida de volume de gás (válvula superior) e de amostras gasosas para serem analisadas por cromatografia gasosa (válvula lateral), além das duas fases que se formavam (líquido sobrenadante e sólido precipitado).

3.1.1 Composição dos Biorreatores

A montagem dos biorreatores, baseada nos resultados obtidos por Priebe *et al.* (2013), foi realizada se adicionando, em cada biorreator:

- 1 g de farelo de couro *wet-blue* (caracterização descrita na Tabela 3, p. 34);
- 25 mL de lodo adensado (Figura 9) (caracterização descrita na Tabela 4, p. 34) como fonte da biota de interesse, coletado da lagoa de aeração da etapa biológica do tratamento de efluentes do curtume Kern-Mattes, que utiliza sais de cromo como agente de curtimento, localizado em Portão, Rio Grande do Sul;
- 250 mL de uma solução de nutrientes, para assegurar condições favoráveis para o crescimento inicial dos microrganismos, proposta por Dettmer *et al.* (2012) (Tabela 6).



Figura 9. Lodo adensado coletado de uma lagoa de aeração de uma estação de tratamento aeróbio de um curtume que utiliza sais de cromo como agente de curtimento.

Tabela 6. Composição da solução de nutrientes adicionada aos biorreatores.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	2
Peptona	1
K ₂ HPO ₄	7
KH ₂ PO ₄	3

Fonte: Priebe *et al.* (2013).

Três diferentes formas de armazenamento prévio do lodo, por aproximadamente seis meses antes do início do experimento, foram testadas:

- Armazenamento em temperatura ambiente e sem vedação para a entrada de O₂ (simulando condições ambientais de armazenamento);
- Armazenamento em temperatura ambiente e sem vedação para a entrada de O₂ com adição de 100 g de colágeno hidrolisado em 1 L de lodo (como fonte de matéria orgânica adicional);
- Armazenamento sob-refrigeração e com vedação para impedir a entrada de O₂ (simulando condições de melhor conservação).

Os experimentos realizados são apresentados na Tabela 7. Realizou-se a montagem deles em períodos diferentes, com defasagem de início das operações de cada montagem de

quatro meses. Realizou-se cada batelada de operação em duplicatas para diferentes formas de armazenamento prévio do lodo adensado. Na Tabela 7, estão assinalados os biorreatores dos quais foi coletada biomassa ao longo de sua operação e nos quais foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

Tabela 7. Experimentos de biodigestão de resíduos.

Biorreator	Montagem	Armazenamento prévio do lodo	Biorreatores com biomassa coletada	Biorreatores com UFL/mL determinada
1	1° montagem	Condições ambientais		
2				
3		Refrigerado e vedado		
4			x	x
5		Condições ambientais com adição de colágeno		
6				
7	2° montagem	Condições ambientais	x	x
8				
9		Refrigerado e vedado	x	
10			x	

Esses experimentos tiveram como objetivo, além da avaliação do armazenamento prévio do lodo, o cultivo da biomassa para que, no momento da produção de biogás com alto teor de metano, fosse realizada a coleta e o isolamento dos microrganismos responsáveis pela produção do metano, os metanogênicos. A primeira montagem de biorreatores teve o objetivo adicional de fornecer um resultado preliminar do tempo de crescimento microbiano nas condições de operação do experimento.

3.1.2 Quantificação dos Gases Gerados – Medidas de Volume

O volume total de biogás gerado nos biorreatores foi medido através de um aparato (Figura 10) baseado no deslocamento de volume de água através da equalização das pressões envolvidas.

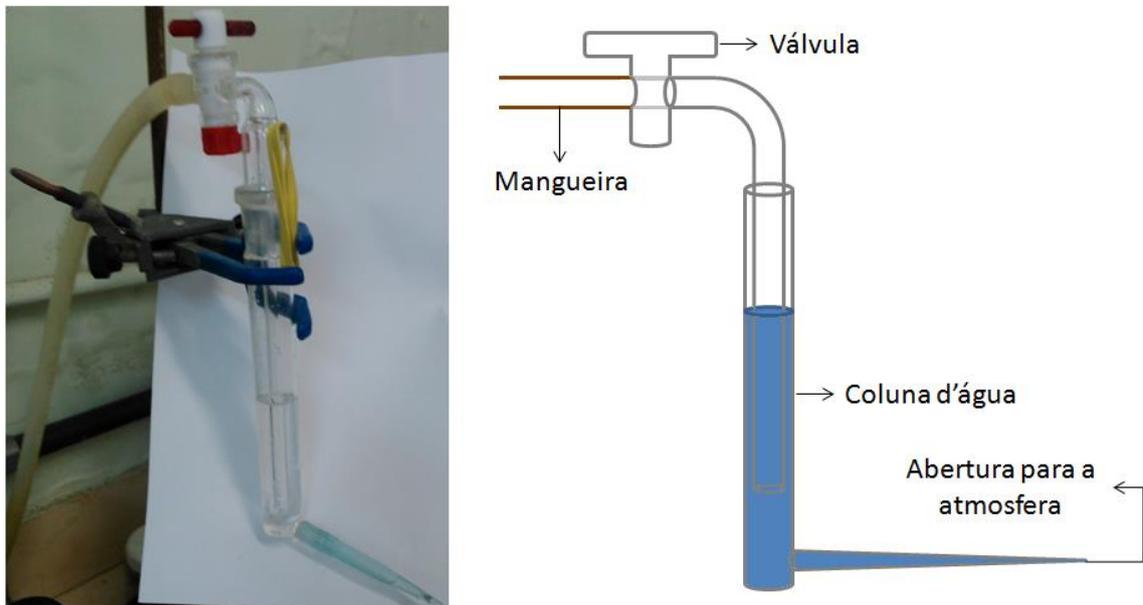


Figura 10. Aparato (foto (esquerda) e esquematização (direita)) utilizado para a medição do volume total de gás gerado nos experimentos, com indicação da válvula de controle para a passagem de gás (pressão), da mangueira conectora com o biorreator de bancada além da coluna de água e da abertura do aparato para o ambiente.

Para a realização da medida (Figura 11), uma mangueira era conectada entre o aparato e o biorreator na sua abertura superior. Primeiramente, a válvula do aparato era aberta para aliviar a pressão remanescente, sendo esse volume de água que saía descartado. A seguir, a válvula do biorreator era aberta liberando uma quantidade de água pelo aparato equivalente ao volume de gás gerado no biorreator. Essa quantidade de água era pesada e convertida em volume através da massa específica da água na temperatura da sala no momento da medida.

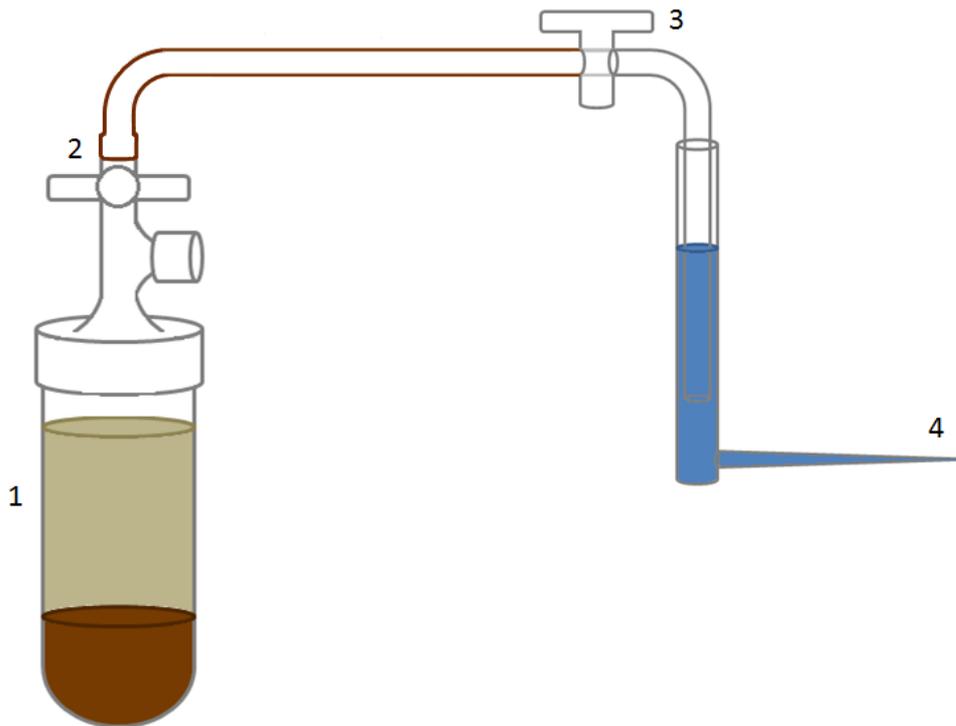


Figura 11. Configuração dos biorreatores e do aparato de medição durante a medida de volume de biogás produzido no biorreator (foto (superior) e esquematização (inferior)). 1: Biorreator; 2: Válvula para o controle da passagem do gás do biorreator e mangueira acoplada; 3: Válvula de controle de entrada do gás no aparato medidor; 4: Coleta do líquido deslocado.

3.2 Coleta de Biomassa

3.2.1 Meio de Cultura Utilizado

O meio de cultura utilizado, baseado no meio de cultivo proposto por Whitman *et al.* (2006), é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Composição das soluções necessárias para a preparação do meio de cultura e solução diluente para o isolamento das arqueas metanogênicas.

Componente	Quantidade (por L)
Extrato de Levedura	2,0 g
Peptona de Caseína (Trypticase)	2,0 g
Solução Salina*	10 mL
Solução de Fosfato (200 g/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	2 mL
Solução de Resazurina (0,5 g/L)	2 mL
Solução de Acetato de Sódio (136 g/L de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$)	10 mL
Solução de Elementos Traço*	10 mL
Solução de Vitaminas*	10 mL
$NaHCO_3$	5,0 g
Cisteína/cloridrato	0,5 g
Ágar (2%)	20 g
Solução Salina	
NH_4Cl	100 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	100 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	40 g
Solução de Elementos Traço	
Ácido Nitriloacético	1,5 g
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	0,2 g
Na_2SeO_3	0,2 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1 g
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 g
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g

Fonte: Whitman *et al.* (2006).

Tabela 8. (continuação) Composição das soluções necessárias para a preparação do meio de cultura e solução diluente para o isolamento das arqueas metanogênicas.

Componente	Quantidade (por L)
Solução de Elementos Traço (continuação)	
AlCl ₃ · 6H ₂ O	0,04 g
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,025 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01 g
Solução de Vitaminas	
Ácido 4-aminobenzoico	10 mg
Ácido Nicotínico	10 mg
Pantotenato de Cálcio (Vitamina B5)	10 mg
Cloridrato de Piroxidina (Vitamina B6)	10 mg
Riboflavina	10 mg
Cloridrato de Tiamina	10 mg
Biotina (Vitamina H)	5 mg
Ácido Fólico	5 mg
Ácido α-Lipóico	5 mg
Vitamina B12	5 mg

Fonte: Whitman *et al.* (2006).

Para a preparação do meio, inicialmente prepararam-se todas as soluções. Após, com exceção da solução de vitaminas, as soluções foram misturadas em um Becker (com capacidade superior ao volume de meio que seria preparado), imerso em banho-maria a 100°C, juntamente com os componentes sólidos e com água destilada (para avolumar até o volume que se desejava preparar), até a sua dissolução completa. Após a dissolução, uma quantidade conhecida de meio de cultivo era disposta nos frascos e estes eram esterilizados a 110°C por 20 min.

A solução de vitaminas, por não poder ser submetida à autoclavagem, devido à alta sensibilidade de seus componentes a altas temperaturas, era esterilizada por filtração (filtro Cellulose Acetate Filter Sartorius Stedim pore size 0,2 µm e pré-filtro médio SeS GF3362, Ø

20 mm, espessura 2,5 mm), e, portanto, só era adicionada ao meio imediatamente antes das sementeiras das diluições (Figura 17a).

A resazurina presente no meio de cultivo atuava como indicador de oxigênio, de forma que inicialmente o meio ficava roxo, depois rosa, indicando presença de oxigênio dissolvido, e, por fim, amarelado, indicando ausência de oxigênio dissolvido (WHITMANN *et al.*, 2006).

3.2.1.1 Modificações no Meio de Cultura

Ao longo das coletas realizadas, algumas modificações foram feitas no meio de cultura com o objetivo de aumentar as chances do isolamento das metanogênicas.

- **Adição de Lodo**

Adicionou-se no meio de cultura 1% (v/v) do lodo adensado (KAPARAJU *et al.*, 2010) antes da autoclavagem, para simular condições similares às do biorreator no meio de cultura.

- **Adição de Agente Microbiano**

Adicionou-se 0,1% (v/v) do antimicrobiano Claforan (Cefotaxima sódica – pó injetável) numa concentração de 100 g/L. O Claforan é um bactericida que inibe a síntese de peptidoglicano bacteriano. Semelhantemente à solução de vitaminas, a solução de antimicrobiano não suporta altas temperaturas, de modo que sua esterilização também foi realizada por filtração, de forma que ela também só fosse adicionada ao meio de cultura junto com as vitaminas.

3.2.2 Coleta de Biomassa dos Biorreatores

Para a coleta da biomassa presente no biorreator, foi necessário abrir a tampa superior do biorreator, expondo-o, dessa forma, ao oxigênio atmosférico. Foram coletadas amostras tanto do sólido precipitado quanto do líquido sobrenadante com uma agulha longa, agulha Raquidiana BD Spinal™ (código: 405211). Para a diluição das amostras e transferências das diluições foram utilizadas seringas tipo insulina de 1 mL, com agulha simples.

3.2.3 Isolamento em Frascos Tipo Penicilina

Escolheram-se frascos tipo penicilina de 50 mL, fechados com tampa de borracha e lacrados com lacre de alumínio (Figura 12), para o isolamento dos microrganismos. Após a preparação do meio, estes frascos permitem a inserção de gases (N_2 e CO_2).



Figura 12. Frascos tipo penicilina de 50 mL, com tampa de borracha e lacre de alumínio, utilizados para o isolamento de microrganismos coletados dos biorreatores.

Inseriram-se, nos frascos, 20 mL do meio de cultivo, supracitado, após a sua total dissolução. Nos experimentos em que se adicionou lodo no meio de cultivo, ele foi adicionado diretamente no frasco tipo penicilina, logo após a adição do meio de cultivo. Adicionou-se também N_2 (Nitrogênio 5.0 IBG) e CO_2 (Dióxido de Carbono 4.0 IBG) em iguais proporções até o preenchimento total dos frascos. O procedimento de adição de gases foi realizado no Laboratório de Controle e Integração de Processos (LACIP II) no Departamento de Engenharia Química da UFRGS. Os frascos foram imediatamente fechados, lacrados e autoclavados, em uma autoclave (Autoclave vertical Modelo AV Phoenix Luterco), por 20 minutos a 0,5 atm. Esse mesmo procedimento (colocação de 20 mL no frasco tipo penicilina, inserção de gases e autoclavagem) também foi realizado com a solução de elementos traço, usada como diluente das amostras, descrita na Tabela 8. Todos esses frascos (com meio de cultivo e com solução de elementos traço) eram armazenados sob refrigeração até o momento da coleta da biomassa dos biorreatores, não excedendo 2 dias de armazenagem.

Para a preparação para a coleta, os frascos com meio de cultivo eram colocados na autoclave por tempo necessário para dissolução do meio e, após, eram mantidos em banho-maria a 56°C. Os frascos com solução de elementos traço eram ambientados em uma estufa bacteriológica (Estufa para Cultura Bacteriológica Digital De Leo) a 35°C por aproximadamente uma hora antes da coleta. A solução de vitaminas e a solução de antibiótico, quando utilizadas, eram então adicionadas através de perfuração da tampa de borracha com auxílio de uma seringa tipo insulina de 1 mL.

Para a diluição das amostras foram feitas diluições na solução de elementos traço. Um volume de 0,1 mL de cada diluição foi semeado nos frascos com meio de cultivo. Realizaram-se quatro experimentos de coleta de alíquotas de biomassa dos biorreatores (Tabela 9). Nas Figuras 13, 14, 15 e 16 é mostrada a esquematização detalhada do procedimento e das características do meio de cada um.

Tabela 9. Descrição dos experimentos de coleta de alíquotas de biomassa dos biorreatores.

Experimento de coleta	Biorreator coletado	Período de incubação	Condições adicionais do meio de cultivo
1	4	118 dias	Coleta do sólido e do líquido
2	7	46 dias	Coleta do sólido e do líquido; frascos com e sem lodo
3	9	101 dias	Coleta somente do sólido; todos os frascos com lodo
4	10	131 dias	Coleta somente do sólido; todos os frascos com lodo; todos os frascos com antibiótico

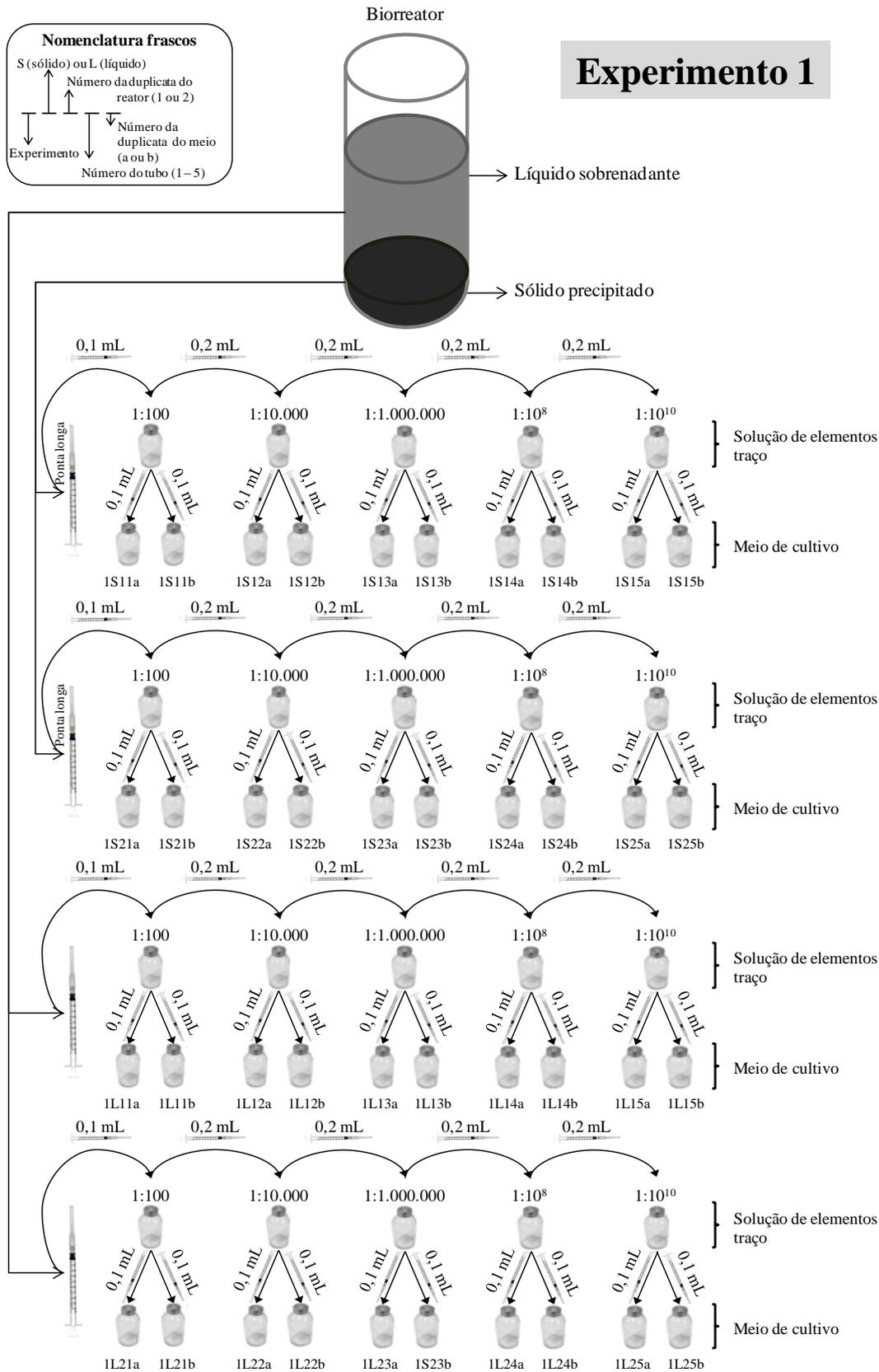


Figura 13. Esquemática do experimento 1 de coleta de biomassa dos biorreatores. Coleta do sólido e do líquido, em duplicata, do biorreator 4 após 118 dias do início do experimento de biodigestão.

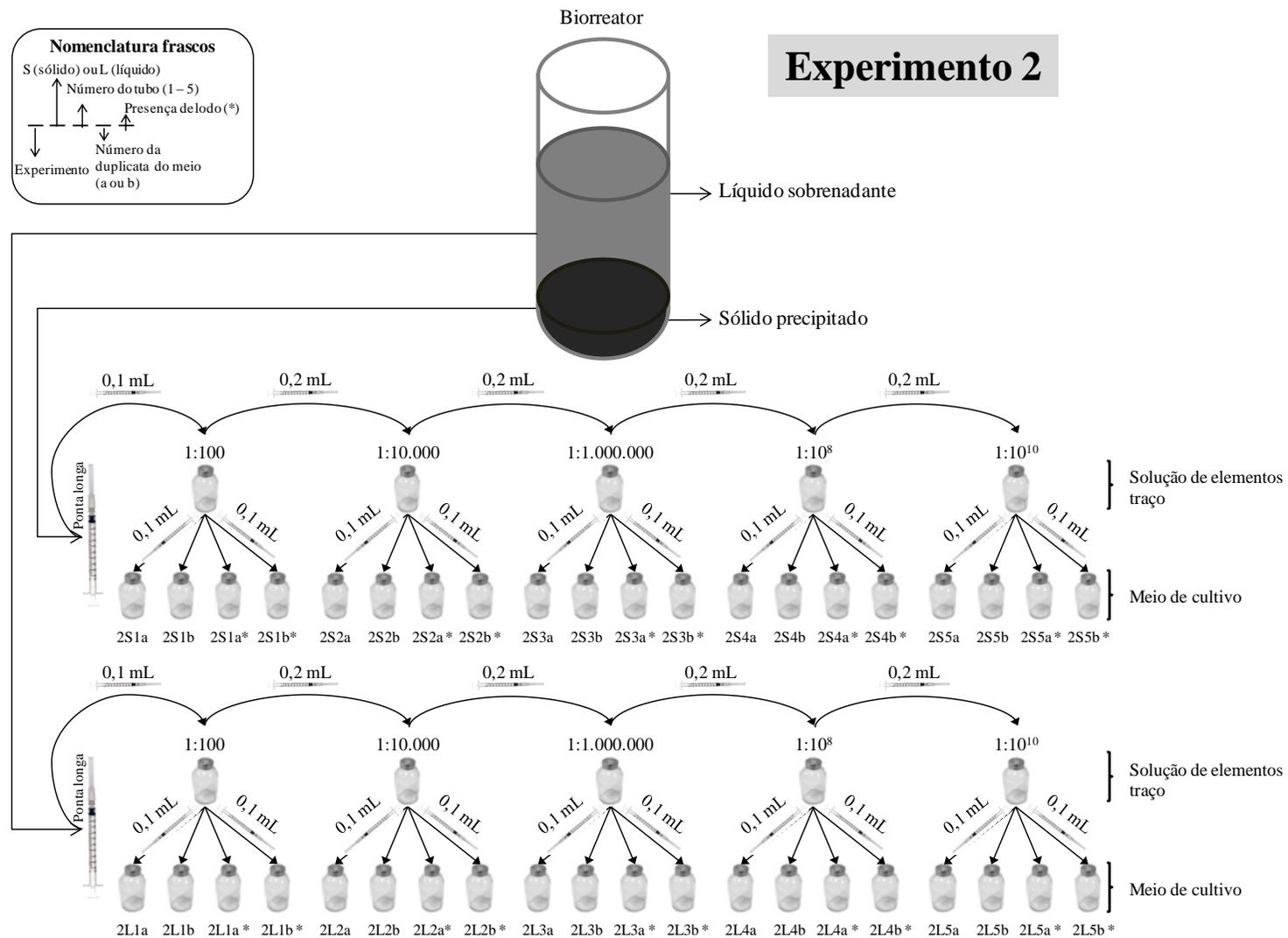


Figura 14. Esquematização do experimento 2 de coleta de biomassa dos biorreatores. Coleta do sólido e do líquido do biorreator 7 após 46 dias do início do experimento de biodigestão, com adição de lodo ao meio de cultivo, antes da autoclavagem, em metade dos frascos.

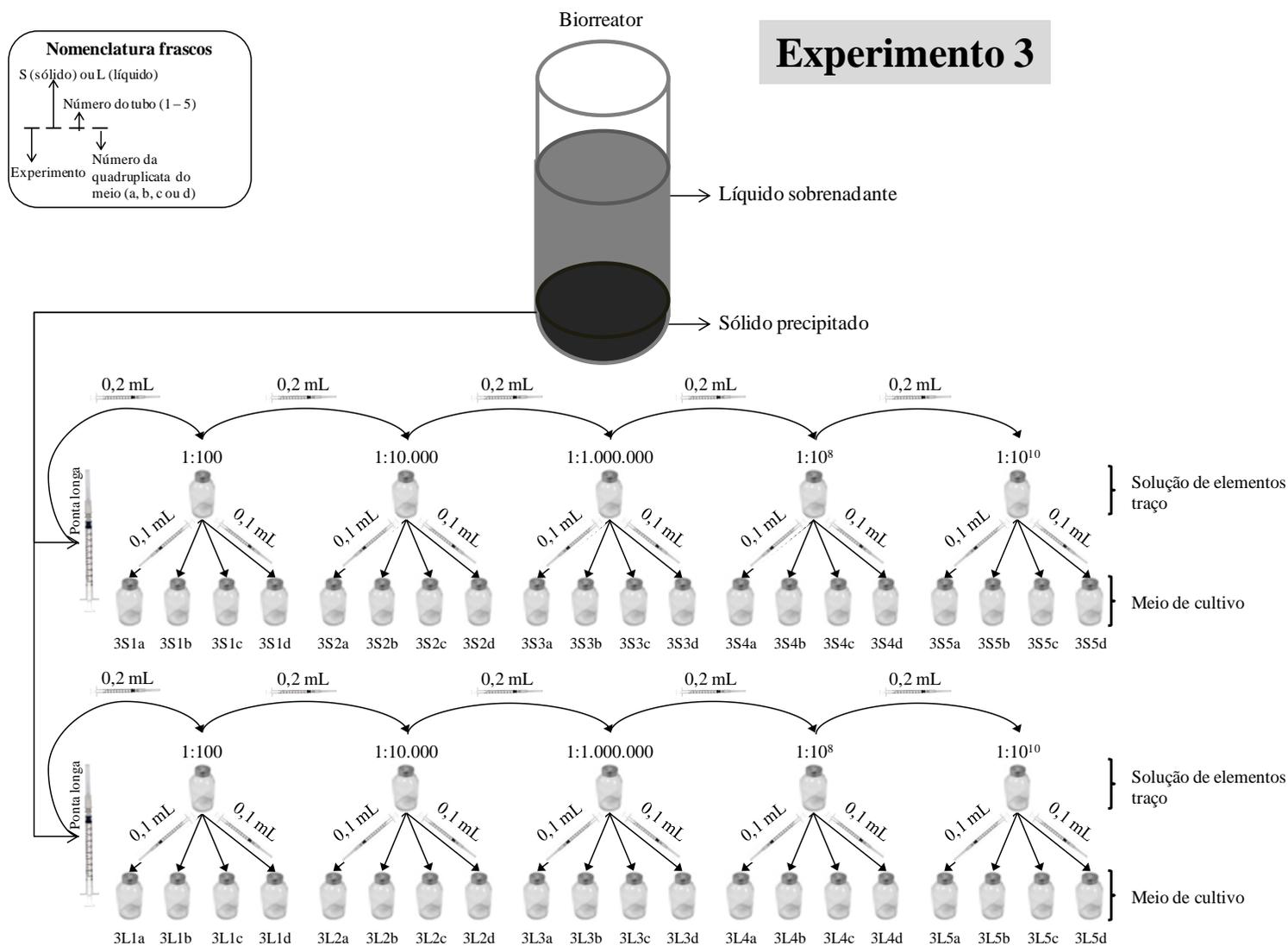


Figura 15. Esquemática do experimento 3 de coleta de biomassa dos biorreatores. Coleta do sólido do biorreator 9 após 101 dias do início do experimento de biodigestão, com adição de lodo ao meio de cultivo, antes da autoclavagem, em todos os frascos.

Todas as transferências de biomassa dos biorreatores e dos frascos tipo penicilina foram realizadas numa cabine de segurança biológica (Pachane Modelo PA 410) (Figura 17b). Após cada perfuração no frasco tipo penicilina selou-se o furo com parafina derretida, proveniente de uma vela acesa, para evitar a entrada de ar (Figura 17c). Para a solidificação do meio de cultivo, após a adição das diluições, posicionaram-se os frascos de forma inclinada (Figura 17d), de forma que a área superficial aumentasse e facilitasse a contagem e coleta das colônias que ali se formariam.

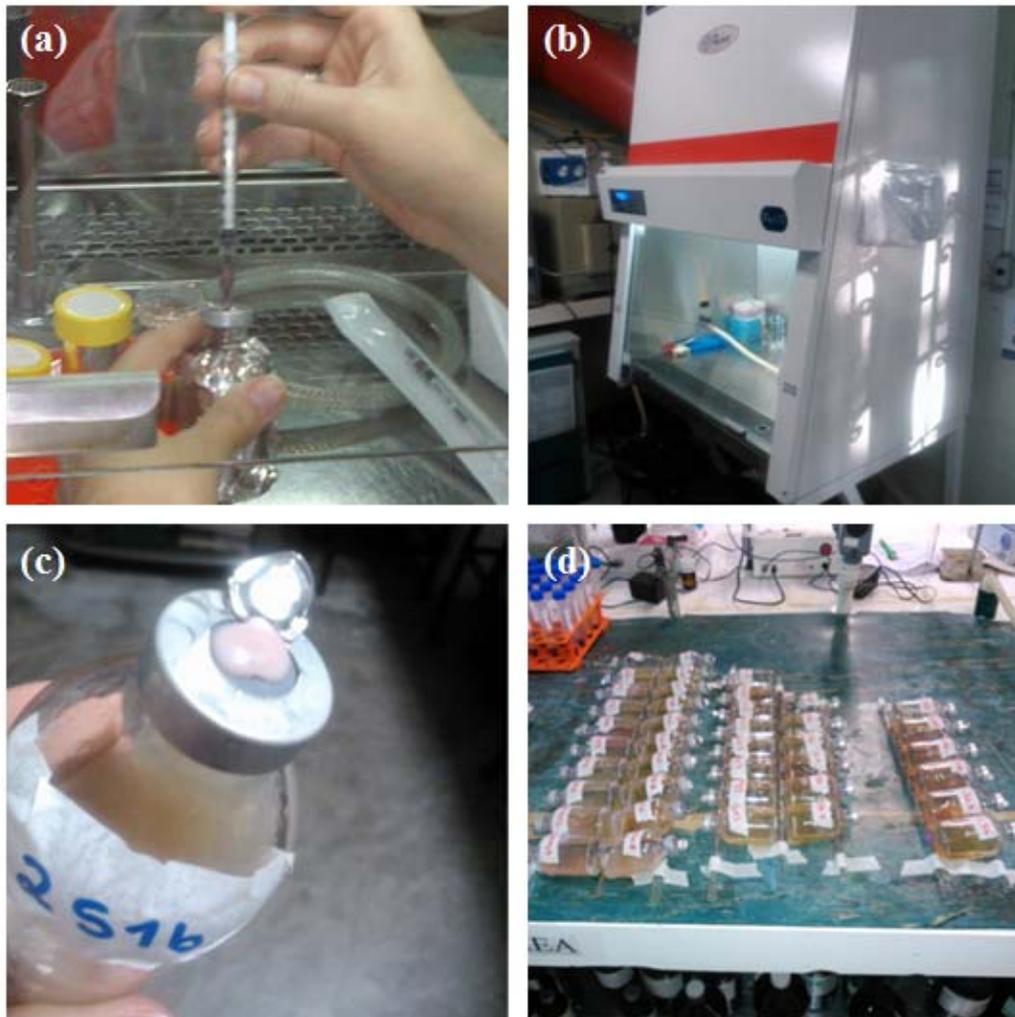


Figura 17. Detalhamento das condições do experimento de isolamento da biomassa coletada dos biorreatores em frascos tipo penicilina de 50 mL: (a) inserção da solução de vitaminas (ou solução de antibiótico) no meio de cultivo; (b) capela de fluxo laminar utilizada; (c) selamento após cada perfuração realizada na tampa de borracha com parafina derretida proveniente de uma vela acesa; (d) solidificação do meio de cultivo de forma inclinada.

Após a solidificação dos meios (Figura 17d), eles foram colocados em uma estufa bacteriológica (Estufa para Cultura Bacteriológica Digital De Leo) a 35°C, mesma temperatura dos biorreatores. Os frascos com solução de elementos traço, utilizados para diluição, eram autoclavados e descartados.

3.2.4 Isolamento das Arqueas Metanogênicas a partir do Crescimento nos Frascos tipo Penicilina

Após o crescimento dos microrganismos e verificação da produção de metano (observação de bolhas e quantificação de metano) dos frascos, foi feito o isolamento destes microrganismos. Para esse isolamento, inseriram-se 0,1 mL da solução de elementos traço (Tabela 8) na região do meio que continha bolhas formadas. Após uma leve agitação, com o fim de misturar a solução adicionada à biomassa ao redor, coletou-se 0,1 mL da mistura formada e inseriu-se a alíquota coletada num frasco com meio de cultivo, cuja preparação foi idêntica ao meio de cultivo utilizado no experimento 4 de coleta. Diferentemente das coletas realizadas nos biorreatores, as diluições foram feitas nos próprios frascos com meio de cultivo. Esse procedimento é ilustrado na Figura 18.

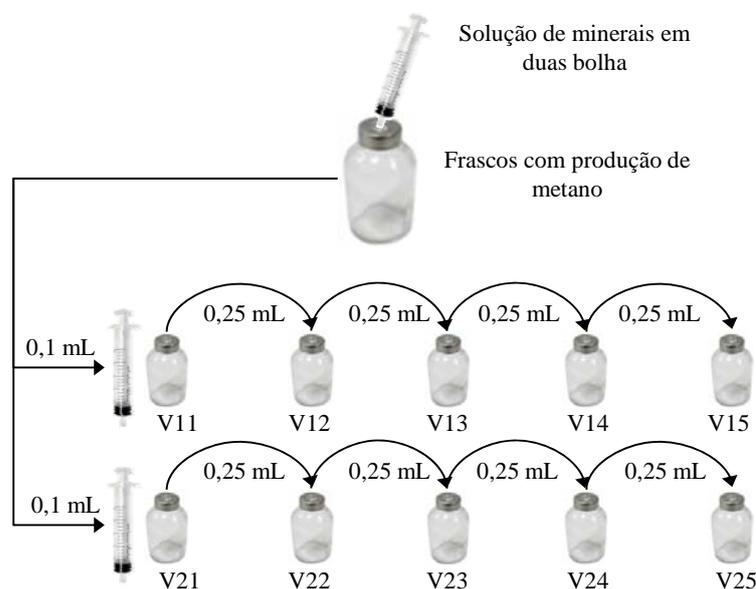


Figura 18. Procedimento de isolamento de arqueas metanogênicas coletadas do frasco com formação de bolhas no meio de cultivo (1S11a).

3.2.5 Isolamento em Placas de Petri

A partir dos resultados de crescimento nos frascos tipo penicilina com meio de cultivo, supracitados, realizou-se o isolamento de algumas colônias em placas de Petri. A preparação do meio de cultivo para as placas foi semelhante à preparação do meio de cultivo para os frascos, salvo algumas exceções:

- Não houve adição de gases. O fechamento do Erlenmeyer utilizado foi feito com uma bucha de algodão e gaze e papel padaria;
- A autoclavagem foi conduzida por 15 minutos a 1 atm;
- A secagem das placas foi feita na capela e elas foram mantidas entreabertas para maior vaporização da água contida.

Para a coleta das colônias formadas nos frascos e isolamento das mesmas, utilizaram-se pipetas Pasteur de vidro estéreis com ponta fechada. E, assim que se terminava o método de esgotamento, cada placa era disposta numa jarra de anaerobiose (PVC Permutation 2,5 L). Todo o procedimento não excedia 8 minutos.

Para geração de atmosfera livre de oxigênio, utilizou-se um gerador de atmosfera de anaerobiose com indicador incorporado (Anaerobac Probac do Brasil). Para controle da atmosfera anaeróbia, utilizou-se *Escherichia coli* (ATCC 10145) e *Pseudomonas aeruginosa* (cepa ambiental) como controle positivo e negativo de crescimento, respectivamente. O cultivo foi realizado à temperatura ambiente com vedação para impedir a entrada de luz, com o auxílio de papel alumínio.

3.3 Qualificação dos Gases Gerados – Análises Cromatográficas

Para se caracterizar o biogás formado e se verificar a presença de arqueas metanogênicas nos experimentos realizados, microrganismos de interesse, pois é através do seu metabolismo que é produzido o metano, utilizou-se cromatografia gasosa para a detecção desse gás.

3.3.1 Qualificação dos Gases Gerados nos Ensaio de Biodegradação

Para a determinação da composição dos gases gerados nos experimentos, utilizou-se um cromatógrafo gasoso equipado com um detector de condutividade térmica (TCD) e duas

colunas empacotadas (12'x1/8'' OD SS Packed Column for Autosystem GC (NOC)), Porapak Q (80/100 Mesh) e Molecular Sieve 13X (80/100 Mesh 100 mg). A primeira coluna, Porapak Q, determinava a fração entre ar ($O_2 + N_2$), metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). A outra, Molecular Sieve 13X, determinava a proporção entre O_2 e N_2 no ar. Hélio foi utilizado como gás de arraste em ambas as colunas. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso AutoSystem XL/GC, Perkin-Elmer, com interface de comando através do software Turbochrom 6.0. As condições de análise são descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições de análises cromatográficas nas duas colunas empacotadas utilizadas.

Parâmetro	Porapak Q	Molecular Sieve 13X
Vazão do gás de arraste (mL/min)	30	20
Temperatura no injetor (°C)	100	80
Temperatura no forno (°C)	60	80
Temperatura no detector (°C)	100	100
Tempo de análise (min)	3	4
Volume de amostra injetado (mL)	0,3	0,3

Fonte: Priebe *et al.* (2013).

Nos biorreatores, as amostras eram coletadas com uma seringa com válvula (Hamilton Sample Lock™ Syringe de 1,0 mL com agulha de 51 mm) através da válvula lateral de cada biorreator (Figura 19). Eram coletados 0,5 mL de amostra gasosa. Imediatamente após a coleta, fechava-se a válvula da seringa e empurrava-se o êmbolo da seringa até 0,4 mL, aumentando-se a pressão dentro da seringa e evitando-se, dessa forma, que o ar ambiente entrasse e interferisse na análise. Quando se chegava ao cromatógrafo, abria-se a válvula da seringa, empurrava-se o êmbolo até 0,3 mL e a amostra era injetada. Esse volume retirado do biorreator era somado ao valor medido de volume de biogás gerado no dia seguinte.

A partir dos valores das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas, fornecidos pelo software, foi possível estimar a quantidade percentual de cada gás ao longo do processo. Primeiramente, dividiam-se todas as áreas obtidas por fatores de resposta obtidos por Dietz (1967) (Tabela 11), necessários para ser obtida a resposta real das quantidades presentes no biorreator (PRIEBE *et al.*, 2013). Para o fator de resposta do ar, primeiro pico mostrado pelas análises na coluna Porapak Q, estimou-se uma média ponderada entre os fatores de resposta do N_2 (80%) e do O_2 (20%). Com as novas áreas obtidas, levou-se em consideração apenas o

percentual entre elas. O tempo do pico não foi rigorosamente considerado devido a sua grande sensibilidade à introdução da amostra no equipamento, dependente do operador.

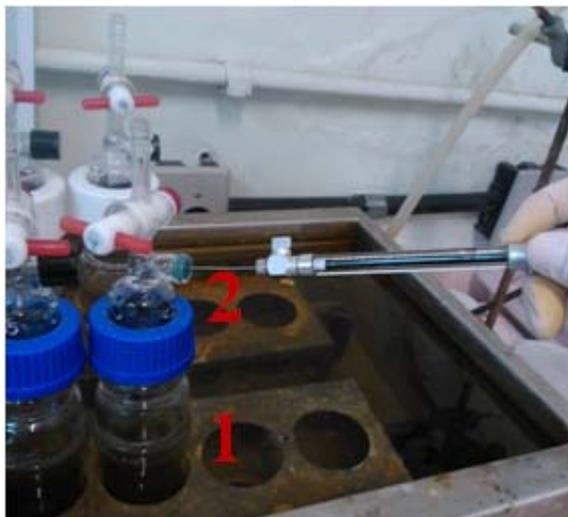


Figura 19. Coleta de amostras dos biorreatores para análise cromatográfica. 1: Biorreator; 2: Válvula para a coleta do gás e seringa coletora.

Tabela 11. Fatores de resposta de cada gás para as colunas utilizadas nas análises cromatográficas.

Gás	Fator de resposta
N ₂	5972,4
O ₂	6042,9
CH ₄	5160,2
CO ₂	1472,4

Fonte: Dietz (1967).

Para o cálculo do percentual dos gases, considerou-se apenas a proporção entre as áreas obtidas nas análises cromatográficas realizadas com a coluna Porapak Q. A coluna Molecular Sieve 13X foi somente utilizada para determinar a proporção entre N₂ e O₂ no pico referente ao ar na coluna Porapak Q. O terceiro pico da coluna Molecular Sieve 13X não foi considerado, pois não consegue separar eficientemente o dióxido de carbono do metano.

3.3.2 Qualificação dos Gases Gerados nos Frascos Tipo Penicilina

Para associar a produção de metano com a presença de arqueas metanogênicas nos frascos com meio de cultivo inoculados, realizou-se cromatografia gasosa destes. O procedimento é idêntico ao procedimento descrito no item 3.3.1., salvo que se perfurou a tampa de borracha do frasco que se desejava realizar a análise cromatográfica, retirou-se

apenas 0,3 mL de cada frasco, realizou-se selamento após cada perfuração realizada na tampa de borracha com parafina derretida proveniente de uma vela acesa (Figura 17c) e não foi feita a análise com a coluna Molecular Sieve 13X.

3.4 Contagem e caracterização das unidades formadoras de colônias (UFC)

Para a estimativa das UFC/mL nos biorreatores, eram escolhidos os frascos que continham entre 30 e 300 UFC.

As colônias isoladas eram testadas pelo método de Gram, para verificar sua forma, parede e arranjo.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Esses resultados dividem-se em dois grupos. O primeiro é a geração e caracterização do biogás nos experimentos conduzidos nos biorreatores, analisados e comparados com os resultados previamente descritos na literatura. O segundo são os resultados da quantificação e dos isolamentos realizados da biomassa coletada dos biorreatores, assim como a análise das colônias geradas nesses frascos, com testes de coloração de Gram e análises cromatográficas para se verificar a presença de metano.

Alguns dos resultados obtidos já foram publicados em congresso (*Isolamento de Arqueas e Bactérias Anaeróbias em Meios Residuais de Curtumes* publicado no COBEQ – XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anexo I) e submetidos em um periódico (*Influence of Sludge Tannery Waste Storage Conditions in Biogas Production* submetido na Brazilian Journal of Chemical Engineering (BJChE) – Anexo II). E será elaborado um artigo com os resultados finais sobre a técnica de coleta e isolamento utilizada.

4.1 Ensaios de Biodegradação

A partir dos valores de volumes de biogás e de metano obtidos em cada biorreator, foi possível calcular o volume acumulado de ambos. Com esses valores, foi analisada a influência das condições de armazenamento prévio do lodo adensado adicionado, através da produção e da qualidade (percentual de metano) do biogás, assim como foi analisada a relação entre o percentual de metano e de oxigênio, tanto no início da biodegradação, quanto após as coletas de alíquotas de biomassa, nos biorreatores onde esse experimento foi realizado.

4.1.1 Geração de Biogás nos Biorreatores

Com os volumes de biogás gerado, medidos diariamente, foi possível obter o volume total acumulado de biogás gerado em cada biorreator. Os ensaios de biodegradação da primeira montagem são mostrados na Figura 20 e os ensaios de biodegradação da segunda montagem são mostrados na Figura 21. Nessas figuras, também são indicados os momentos em que foram realizadas as coletas de alíquotas de biomassa.

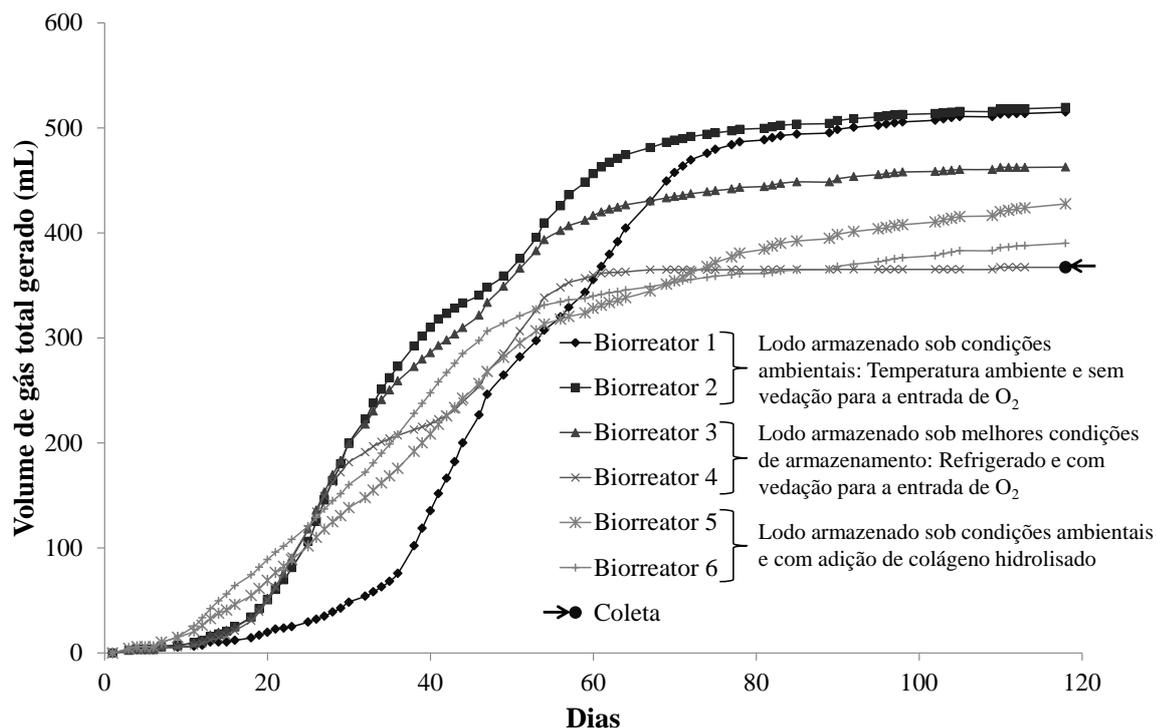


Figura 20. Volume total acumulado de biogás gerado em cada biorreator da primeira montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.

As diferenças entre as duplicatas são devidas, possivelmente, a erros experimentais durante a medida do volume de biogás gerado e na vedação dos biorreatores ou às diferentes condições desenvolvidas em cada biorreator, que favorecem diferentes comunidades microbianas. Estas podem se atribuir a diversos fatores, entre eles, ao lodo adicionado, que é de difícil homogeneização, ao cultivo, à diluição, à temperatura, entre outros.

O biorreator 7, 2^a montagem com lodo armazenado em condições ambientais (Figura 21), foi o único que teve sua biomassa coletada em sua fase exponencial de produção de biogás. Observa-se que, após a sua abertura para a realização da coleta, o biorreator iniciou novamente as fases de crescimento, tendo uma segunda fase de adaptação, uma segunda fase

exponencial de produção e, por fim, uma fase estacionária. Esse fenômeno pode ter ocorrido pela entrada de oxigênio e/ou à homogeneização do lodo com a fase líquida.

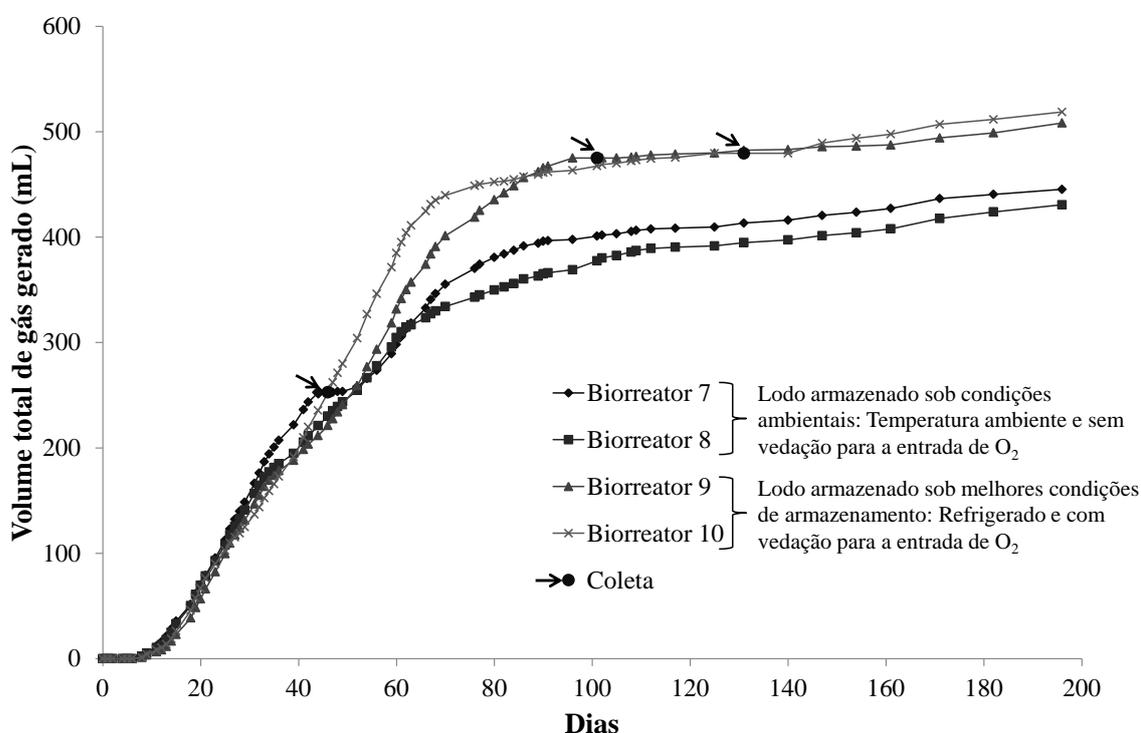


Figura 21. Volume total acumulado de biogás gerado em cada biorreator da segunda montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.

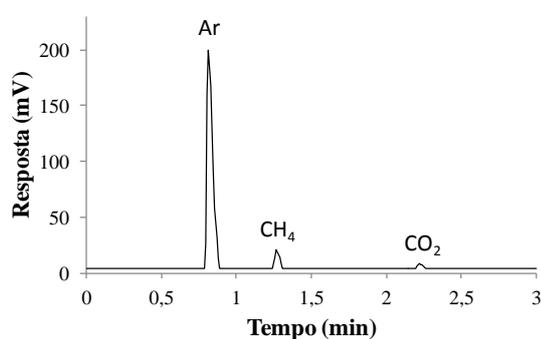
Em todas as curvas apresentadas (Figura 20 e 21), há a presença de três fases de geração de gás distintas. A primeira, observada até o dia 20 em ambas as montagens, apresenta baixa geração de gás, pois os microrganismos estão se adaptando às novas condições de incubação. A segunda, observada entre os dias 20 e 70 em ambas as montagens, aproximadamente, apresenta uma produção máxima de gás, devido, provavelmente, à grande quantidade de nutrientes presentes no meio. A última, observada a partir do dia 70 em ambas as montagens, aproximadamente, apresenta uma fase de baixa geração de gás, pois os nutrientes, por ser um meio fechado, sem adição de nutrientes, estão se esgotando. Esse comportamento também foi encontrado por Priebe *et al.* (2013) e Kipper (2013).

4.1.2 Geração de Metano nos Biorreatores

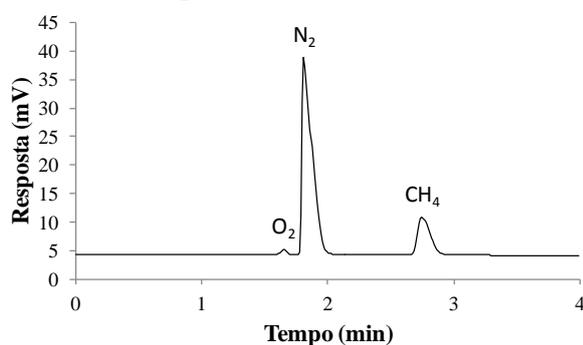
As análises cromatográficas realizadas tinham o objetivo de caracterizar os gases produzidos nos biorreatores. As duas colunas empacotadas utilizadas, Porapak Q e Molecular Sieve 13X, detectavam os principais compostos presentes: nitrogênio (N_2), oxigênio (O_2),

metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). Há a possibilidade da existência de hidrogênio (H_2) no biogás gerado, entretanto, as condições das análises cromatográficas impossibilitaram a sua detecção, devido ao hélio (He , utilizado como gás de arraste) e o hidrogênio terem uma resposta térmica muito próxima. Exemplos de cromatogramas gerados no início e no final do experimento são mostrados na Figura 22, onde se vê a diferença nas proporções entre cada gás ao longo do experimento, muito ar e pouco metano e dióxido de carbono no início (Figura 22a e 22b) e pouco ar e muito metano e dióxido de carbono mais ao final (Figura 22c e 22d).

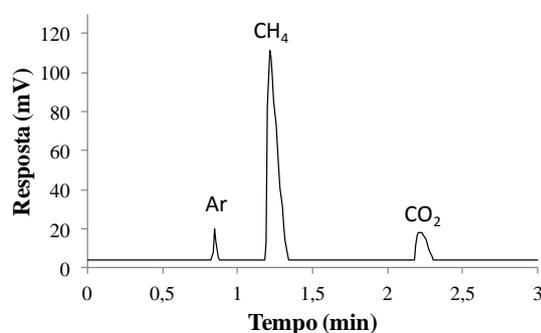
(a) Porapak Q - 14 dias de experimento - Reator 8



(b) Molecular Sieve 13X - 14 dias de experimento - Reator 8



(c) Porapak Q - 41 dias de experimento - Reator 8



(d) Molecular Sieve 13X - 41 dias de experimento - Reator 8

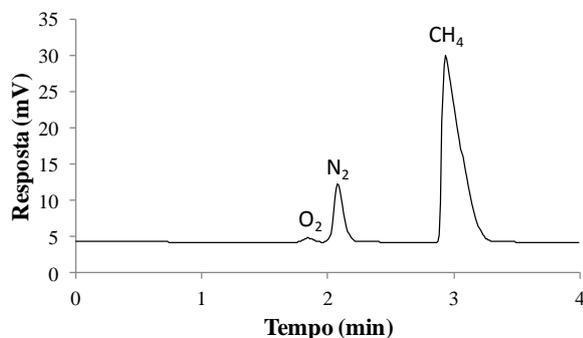


Figura 22. Exemplos de cromatogramas gerados, em mV x s, com amostras coletadas na segunda semana de experimento – (a) e (b) – e com amostras coletadas na sexta semana de experimento – (c) e (d) – do biorreator 6 (2ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais).

Uma vez obtido o percentual de cada gás nos dias em que se realizou a cromatografia (frequência semanal), estimou-se comportamento linear entre dois dias de realização da medida, obtendo-se assim o percentual estimado de cada gás nos dias em que não se realizou a análise cromatográfica. Multiplicou-se o percentual obtido de cada gás em todos os dias pelo volume total de biogás obtido nos mesmos e, dessa forma, encontrou-se o volume de

cada gás produzido em cada dia. O volume acumulado de metano (CH_4) gerado em ensaio de biodegradação da primeira montagem é mostrado na Figura 23 e da segunda montagem na Figura 24. Também são indicados os momentos em que foram realizadas as coletas de alíquotas de biomassa dos ensaios em que esse experimento foi realizado.

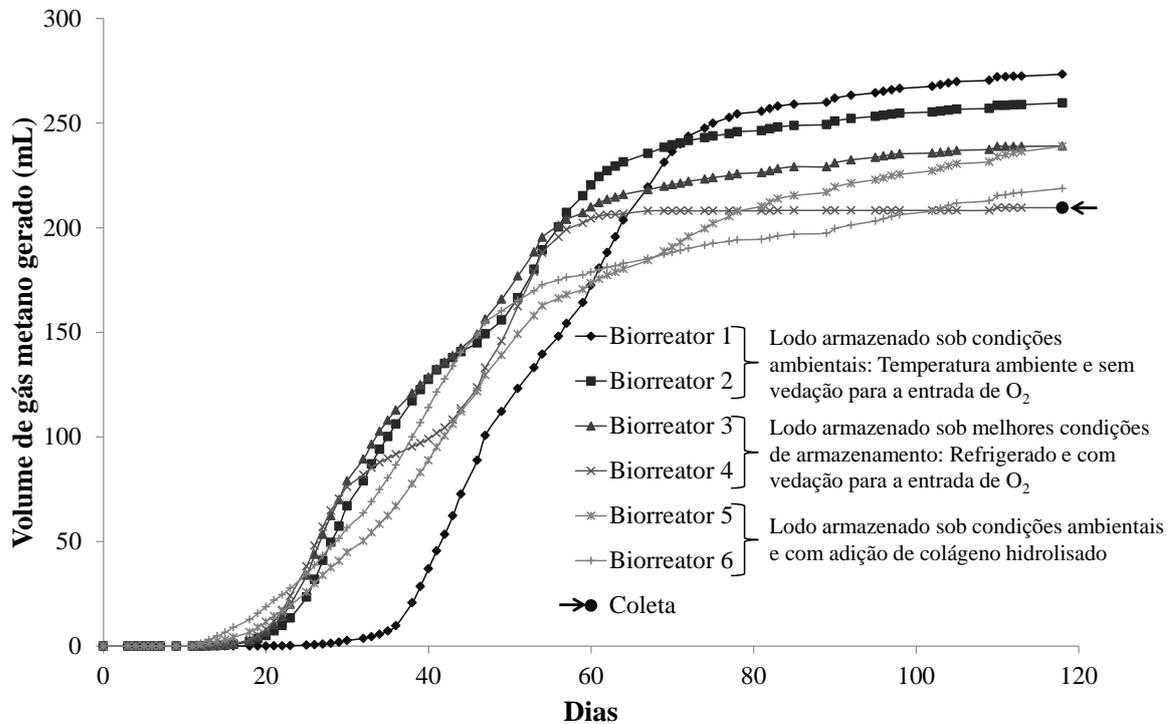


Figura 23. Volume acumulado de metano (CH_4) gerado em cada biorreator da primeira montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.

Observa-se que a produção de metano teve comportamento similar ao da produção de biogás, entretanto, com algumas variações. Em todas as duplicatas, com exceção dos biorreatores 3 e 4 e dos biorreatores 5 e 6, os biorreatores que mais produziram biogás, produziram menos metano. Por exemplo, na primeira batelada de montagem dos biorreatores, o biorreator 2 foi o que mais produziu biogás, porém, foi o biorreator 1 que mais produziu metano. O mesmo aconteceu entre as duplicatas dos biorreatores 7 e 8 e dos biorreatores 9 e 10. Isso se deve, provavelmente, à diferença de composição do lodo, devido a sua difícil homogeneização. Não foi possível observar esse comportamento na duplicata dos biorreatores 3 e 4, devido a um problema de vedação do biorreator 4, que será melhor visualizado e discutido no item 4.1.4. A duplicata 5 e 6 não apresentou esse comportamento, sendo que o biorreator 5 produziu mais biogás e mais metano. Acredita-se que o colágeno adicionado

como fonte de matéria orgânica prontamente disponível minimizou as possíveis diferenças entre a composição do lodo, devido a ele ter sido a principal fonte de carbono.

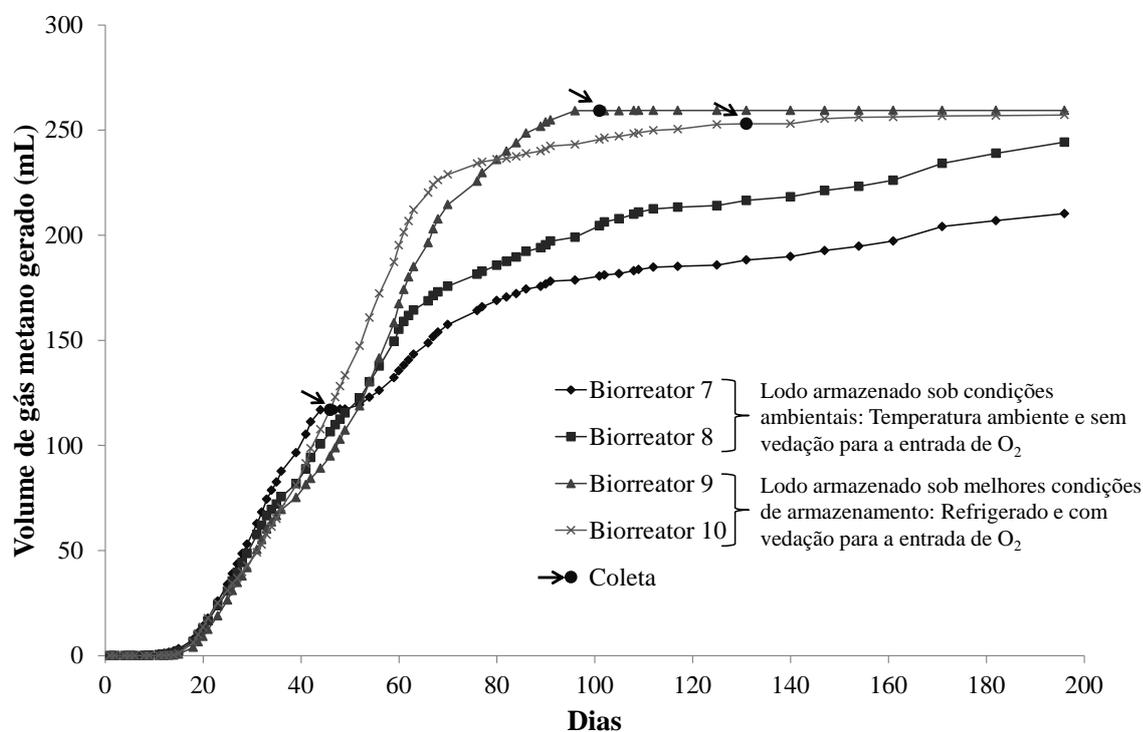


Figura 24. Volume acumulado de metano (CH_4) gerado em cada biorreator da segunda montagem com relação ao tempo e indicação das coletas de alíquotas de biomassa realizadas.

Priebe *et al.* (2013) e Kipper (2013) realizaram experimentos semelhantes de biodigestão destes resíduos. Priebe *et al.* (2013) variou a fonte de carbono: além de farelo de couro *wet-blue* (couro curtido ao cromo), utilizou farelo de soja, colágeno hidrolisado e pó de pele e testou diferentes lodos. Kipper (2013) variou a quantidade de lodo adensado adicionada aos ensaios de biodegradação, entre 50 e 200 mL e realizou pré-tratamento enzimático. A Tabela 12 compara os resultados obtidos com os resultados encontrados por ambos nas condições de análises semelhantes (ensaios com lodo aeróbio proveniente de estação de tratamento de curtumes com farelo de couro *wet-blue*).

Tabela 12. Valores máximos e mínimos de biogás e de metano encontrados por Priebe *et al.* (2013) e por Kipper (2013) em ensaios de biodegradação com lodo proveniente de estação de tratamento de efluente de curtume e com farelo de couro *wet-blue*.

	Este trabalho		Priebe <i>et al.</i> (2013)	Kipper (2013)	
	Mínimo	Máximo	Único	Mínimo	Máximo
Volume de Biogás produzido (mL)	380	530	400	380	650
Volume de metano (CH₄) produzido (mL)	210	270	320	240	340

Comparando os valores mostrados na Tabela 12, vê-se que os valores de produção acumulada de biogás e de metano nos experimentos de biodegradação realizados estão dentro da faixa esperada.

4.1.3 Análise da Influência do Armazenamento Prévio do Lodo na Biodegradação

As condições de armazenamento do lodo são um fator importante quando o processo de biodegradação de resíduos de curtumes for projetado e escalonado para escala industrial. A influência do armazenamento prévio do lodo adensado adicionado aos ensaios de biodegradação foi observada através dos resultados de produção de biogás e de produção de metano, previamente apresentados nas Figura 20, 21, 23 e 24. Devido à adição prévia de colágeno hidrolisado ao lodo, os biorreatores 5 e 6 não foram considerados nessa análise.

Na primeira montagem, os biorreatores com lodo armazenado sob condições ambientais (temperatura ambiente e sem vedação para a entrada de oxigênio), biorreatores 1 e 2, apresentaram maior produção tanto de biogás quanto de metano do que os demais biorreatores da 1ª montagem. Diferentemente, na segunda montagem, os biorreatores com lodo armazenado sob melhores condições de armazenamento (refrigerado e com vedação para impedir a entrada de oxigênio), biorreatores 9 e 10, apresentaram maior produção tanto de biogás quanto de metano do que os demais biorreatores da 2ª montagem. Dessa forma, o armazenamento prévio do lodo não mostrou influência conclusiva sobre a produção de biogás e de metano.

Entretanto, vale destacar que foi coletada uma alíquota de biomassa do biorreator 7 e que, dessa forma, a quantidade acumulada de biogás e de metano produzidas são, muito

provavelmente, menores do que as que ele produziria caso não tivesse sido feita essa coleta, pois, antes da coleta, como pode-se ver nas Figura 21 e 24, ele era o que apresentava maior produção de gás. Dessa forma, como o biorreator 8 ficou sem uma duplicata para controle, os resultados de geração de gás apresentados por esses dois biorreatores (7 e 8) não podem ser totalmente considerados para a análise da influência do armazenamento prévio do lodo adensado nos ensaios de biodegradação.

4.1.4 Interferência da Presença de Oxigênio na Metanogênese

A relação entre o percentual de metano e de oxigênio nos biorreatores é importante, pois tem relação direta sobre a influência do oxigênio na metanogênese, visto que essa é uma reação que só ocorre em anaerobiose estrita. Da Figura 25 à Figura 34 são mostrados os percentuais de metano e de oxigênio em cada biorreator ao longo do tempo, assim como é indicado o momento em que se coletaram alíquotas de biomassa, nos biorreatores onde esse experimento foi realizado.

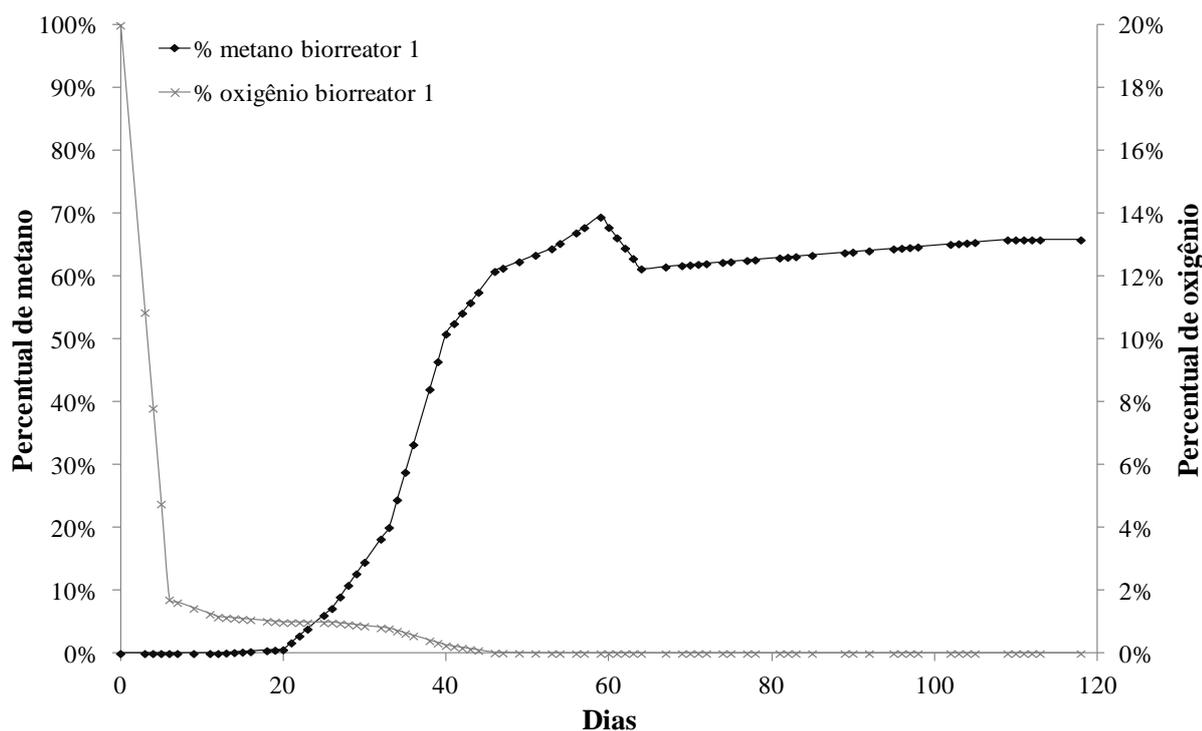


Figura 25. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 1 (1ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais).

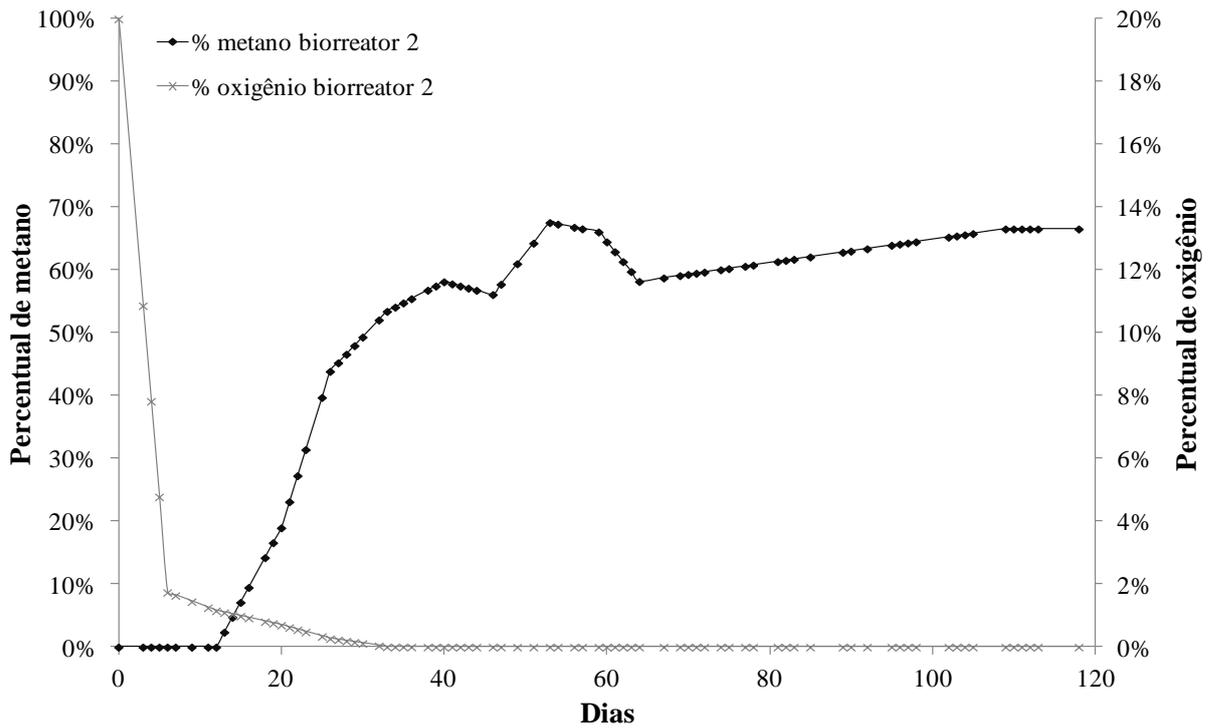


Figura 26. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 2 (1ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais).

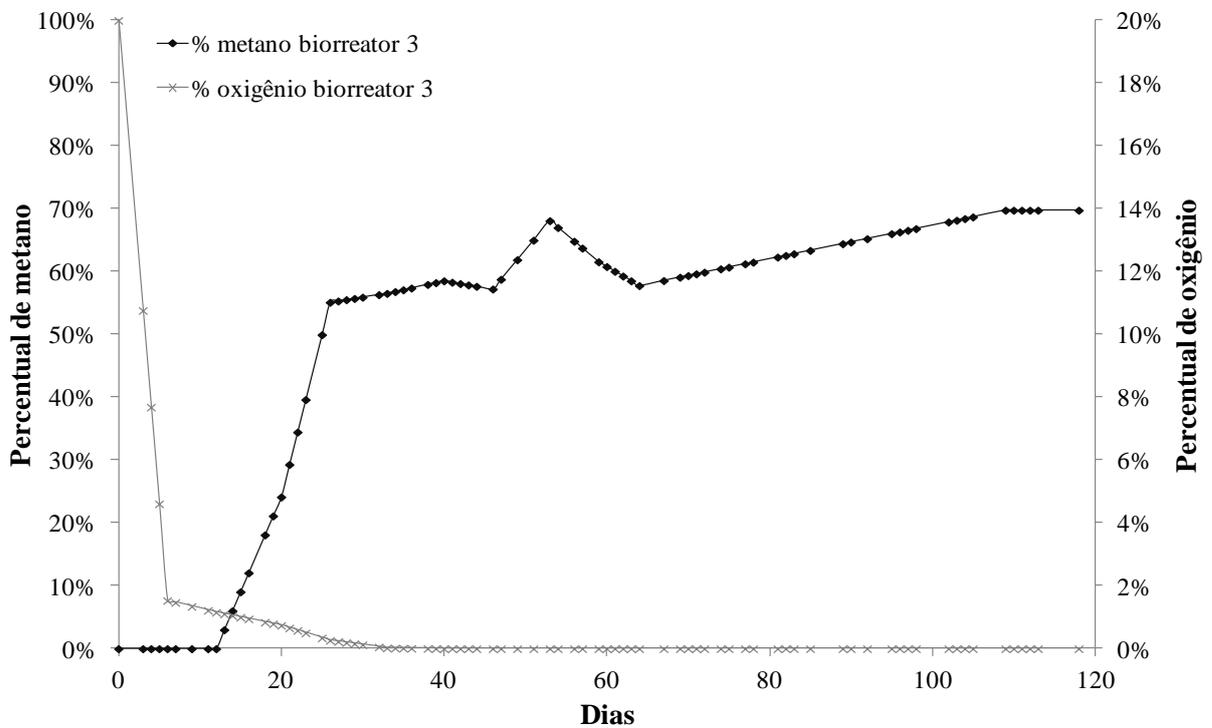


Figura 27. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 3 (1ª montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento).

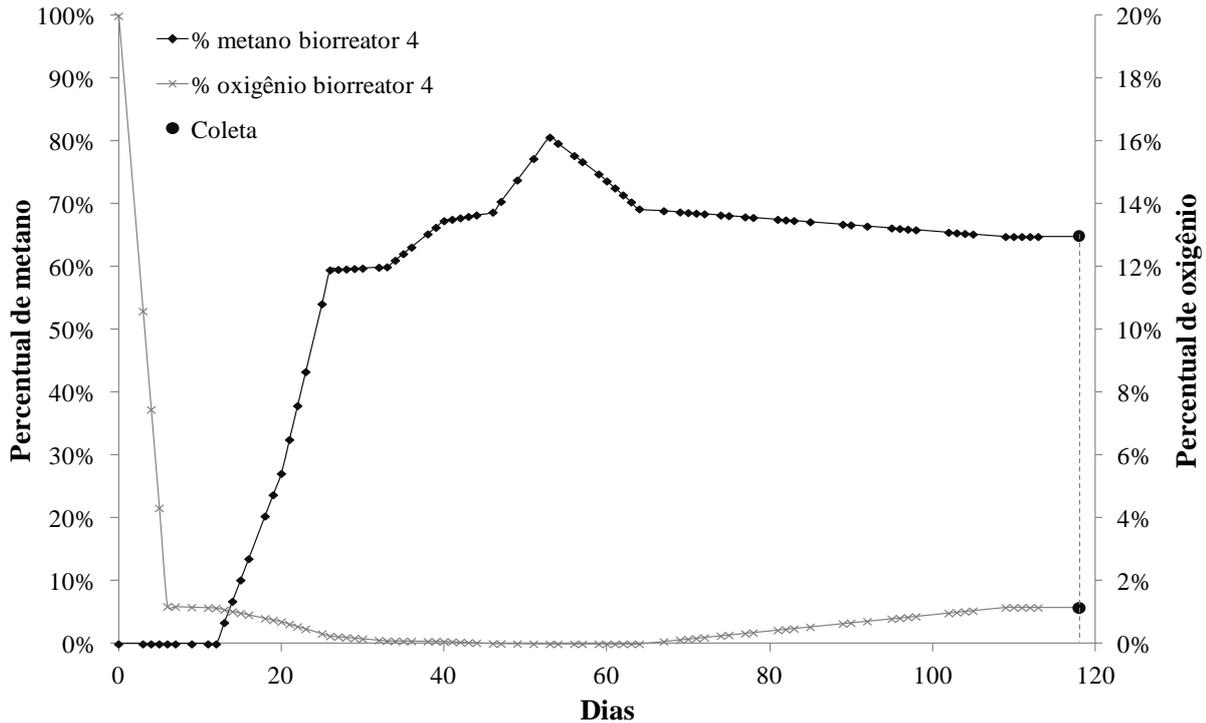


Figura 28. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 4 (1ª montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.

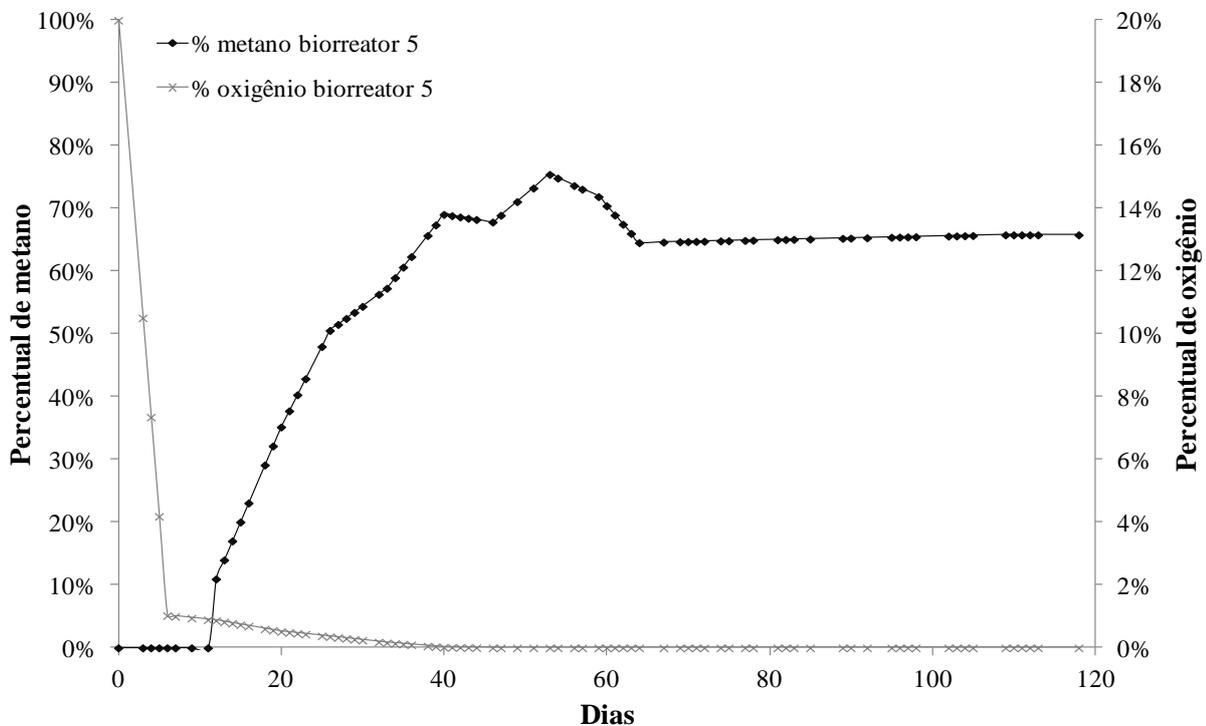


Figura 29. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 5 (1ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais e com adição de colágeno hidrolisado).

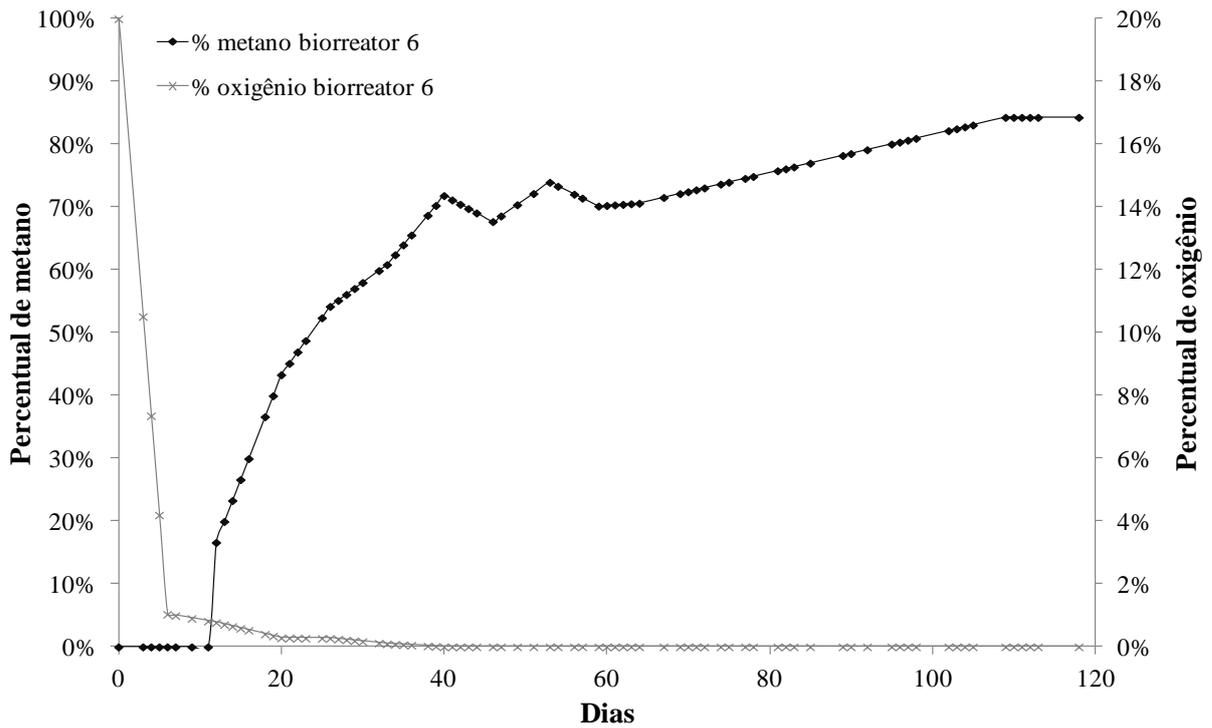


Figura 30. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 6 (1ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais e com adição de colágeno hidrolisado).

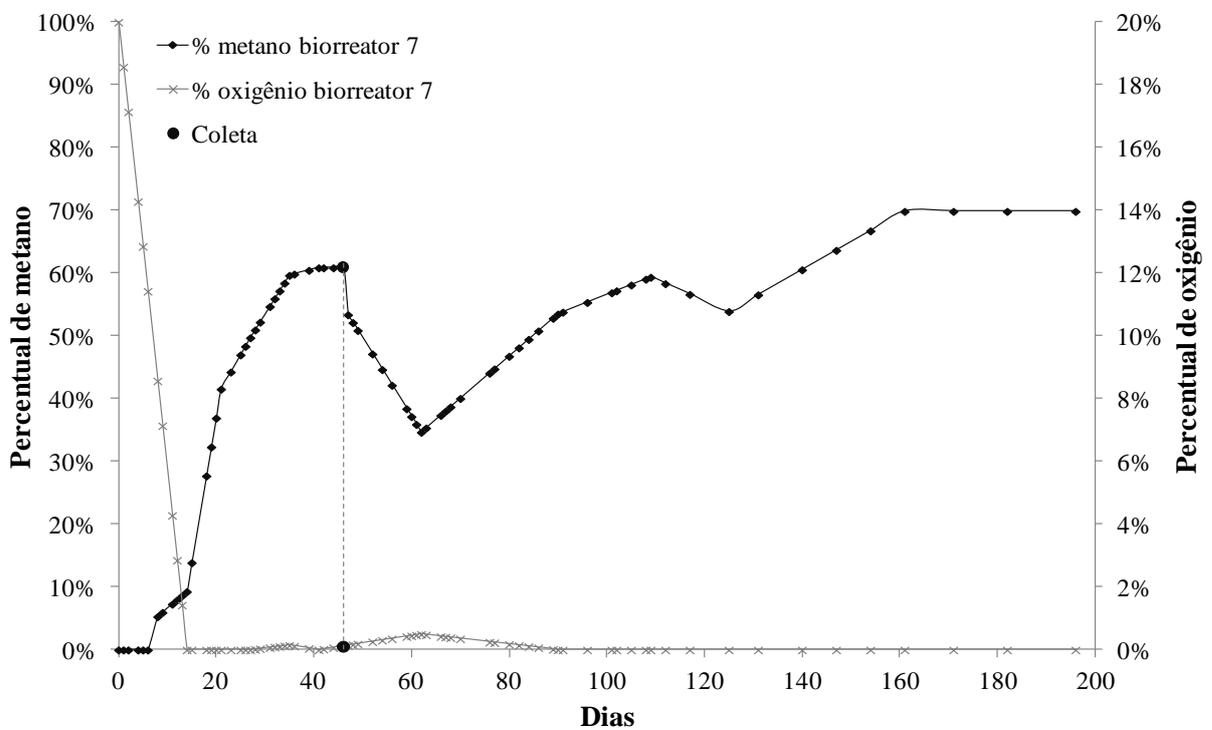


Figura 31. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 7 (2ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.

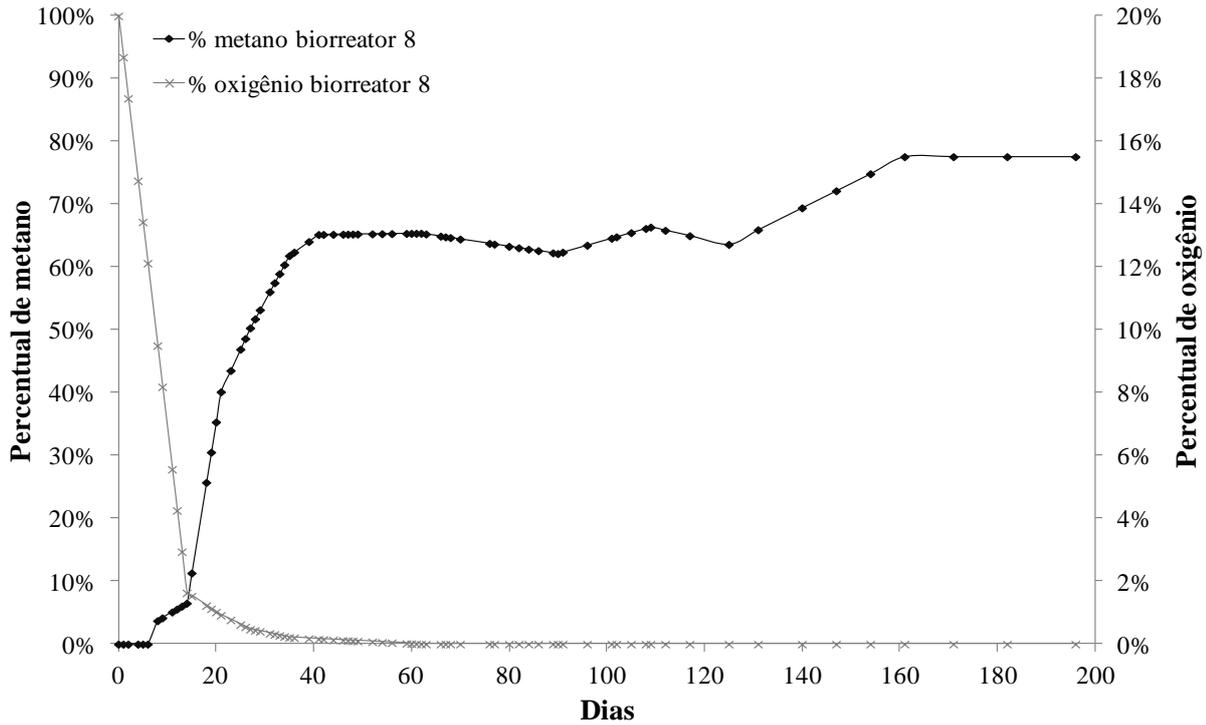


Figura 32. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 8 (2ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais).

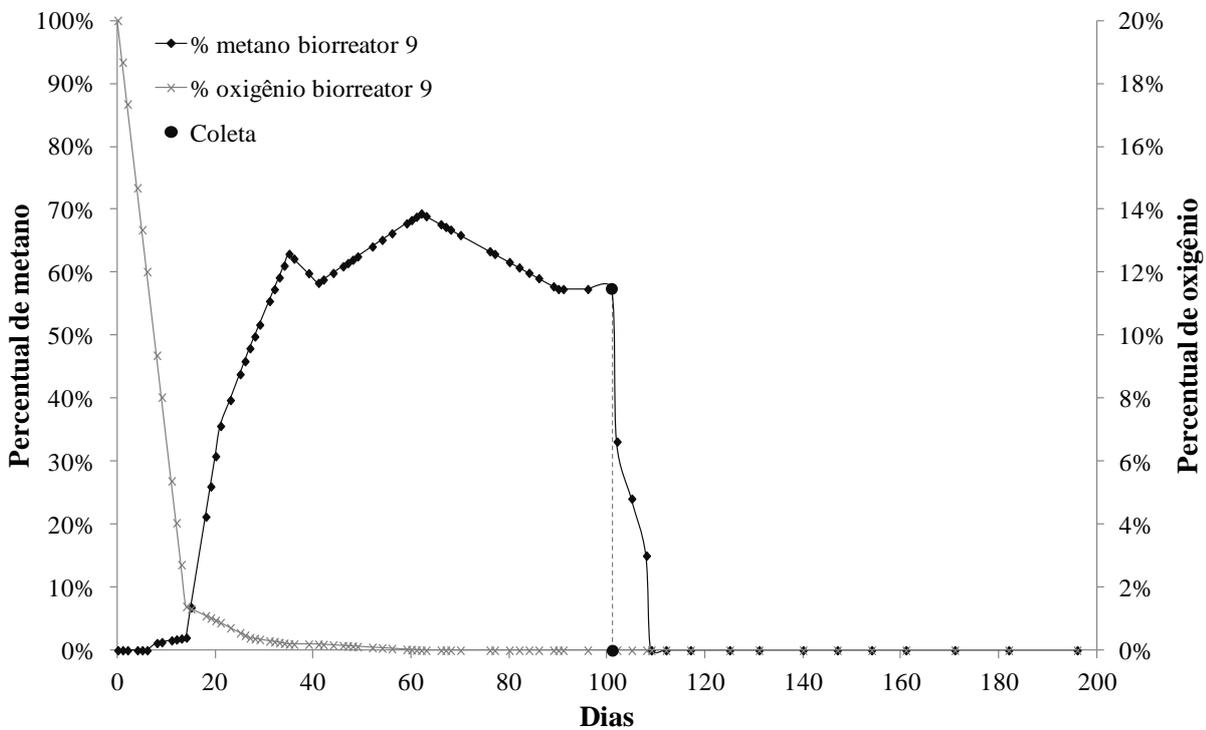


Figura 33. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 9 (2ª montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.

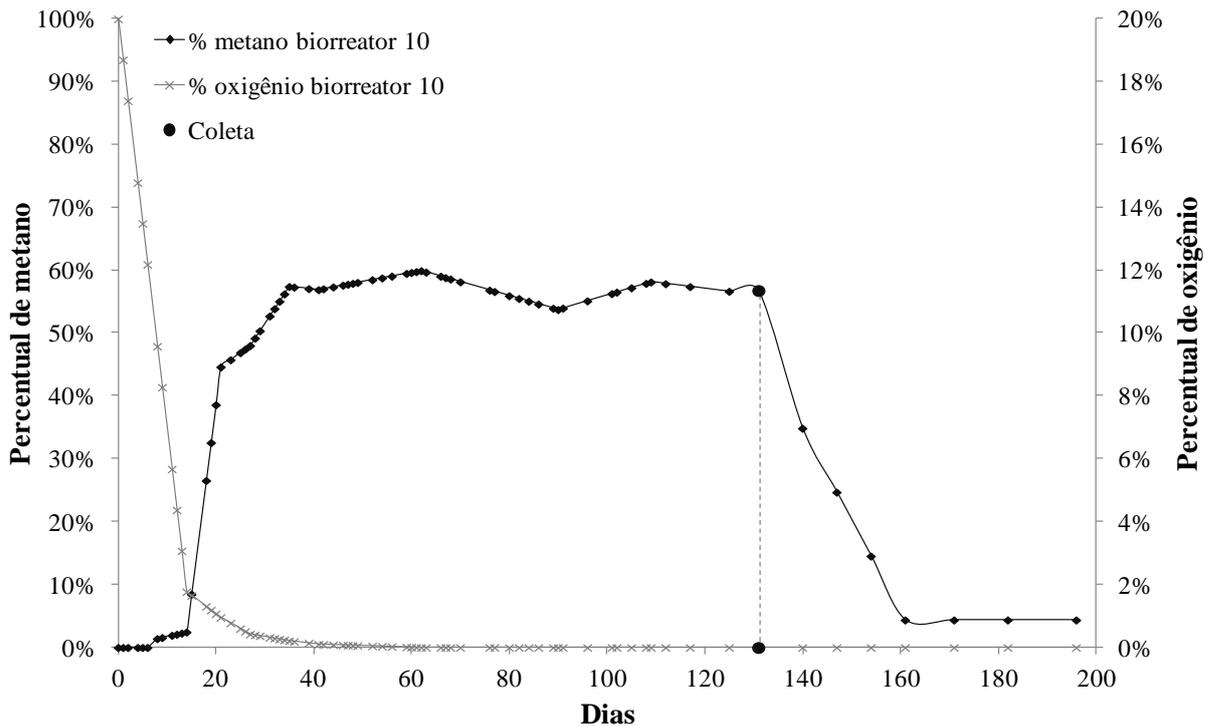


Figura 34. Percentual de metano e de oxigênio ao longo do tempo no biorreator 10 (2ª montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento) e indicação da coleta de alíquota da biomassa.

Pode se observar, em todos os experimentos, que por volta de 20 dias a presença de oxigênio já é muito baixa, entre 1 e 2%, e coincide com o início da ascensão na produção de metano.

Em todos os biorreatores, observa-se que a produção de metano iniciou antes do oxigênio presente ser totalmente consumido. Isso é devido, provavelmente, ao baixo coeficiente de difusão do oxigênio, de forma que, mesmo ainda presente no biorreator, não impedia a formação de zonas de anaerobiose onde a atividade metanogênica se estabelecia.

O consumo de oxigênio dentro dos biorreatores apresentou, em todas as curvas (Figuras 25 a 34), dois comportamentos distintos. O primeiro, observado até o dia 10, aproximadamente, apresenta uma grande queda no percentual, de aproximadamente 90%. O segundo, observado a partir do dia 10, aproximadamente, apresenta uma queda mais suave de percentual. Esses comportamentos sugerem 2 cinéticas distintas do consumo de oxigênio nos ensaios de biodegradação. A primeira etapa sugere uma cinética de ordem zero, o que é esperado, pois há uma grande quantidade de nutrientes no início do experimento. A segunda

etapa sugere uma cinética de primeira ordem, onde a quantidade de nutrientes é proporcional à velocidade de consumo.

No biorreator 4 (Figura 28), 1ª montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento, vê-se que a entrada de oxigênio, por volta do 70º dia de experimento, diminuiu gradativamente o percentual de metano, entretanto, não vetou completamente a geração de metano. Porém, como isso é provavelmente devido a algum vazamento por má vedação do biorreator, todo o biogás que era produzido, acabava sendo liberado pela diferença de pressão, de modo que não se media mais nenhum volume de biogás total produzido.

No biorreator 7 (Figura 31), 2ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais, onde houve coleta de biomassa quando a produção de biogás estava máxima, houve um aumento no percentual de oxigênio a partir do dia da coleta, dia 46, que posteriormente voltou a zero. Também é observada uma grande queda no percentual de metano, mas que, devido à grande quantidade de nutrientes ainda presentes, conseguiu se reestabelecer. Entretanto, nos biorreatores 9 (Figura 33) e 10 (Figura 34), onde a coleta de alíquotas de biomassa foi feita quando a produção de biogás e de metano já estavam em fase estacionária, o percentual de metano teve uma grande queda mas não conseguiu se reestabelecer, devido, provavelmente, à pequena quantidade de nutrientes remanescentes, que pode ser estimada baixa devido à associação desta com a baixa geração de gás.

4.2 Quantificação e Isolamento de Arqueas da Biomassa Extraída

A partir dos experimentos de coleta de alíquotas de biomassa dos biorreatores e subsequente semeadura para quantificação e isolamento em meio de cultivo próprio para arqueas metanogênicas, foram feitas a contagem de UFC formadas e isolamento dessas colônias, coloração de Gram, além de análises cromatográficas nos próprios frascos com o objetivo de se verificar a validade do método de coleta e a influência das alterações nele feitas, assim como a presença dos microrganismos de interesse, as arqueas metanogênicas.

4.2.1 Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)

A contagem do número de UFC foi feita nos frascos resultantes dos experimentos 1 e 2 de coleta após três semanas de incubação (os resultados são mostrados no Anexo III). Para a obtenção de uma estimativa do número de UFC por mL de cada fase do biorreator em que foi

realizada a coleta, sólido precipitado e líquido sobrenadante, foram utilizados os frascos que apresentaram contagens entre 30 e 300 UFC. O resultado, obtido através do cálculo através das sucessivas diluições, é mostrado na Tabela 13.

Verifica-se na Tabela 13 que, como esperado, a quantidade de UFC/ml do sólido precipitado é muito maior que a quantidade de UFC/mL do líquido sobrenadante. Observa-se também que a adição de lodo adensado (1% v/v) no meio de cultivo não mostrou influência significativa na quantidade de UFC formadas.

Tabela 13. Estimativa de UFC/mL em cada fase dos biorreatores 4 e 7.

Experimento coleta – fase	Biorreator	Média de UFC entre frascos	UFC/mL
1 – sólido	4	95	$1,90 \times 10^9$
1 – líquido		22,25	$4,45 \times 10^6$
2 – sólido	7	67,5	$1,35 \times 10^9$
2 – sólido*		54,5	$1,09 \times 10^9$
2 – líquido		45,5	$9,10 \times 10^6$
2 – líquido*		41,5	$8,30 \times 10^6$

(*) experimentos com lodo adicionado ao meio de cultivo antes da autoclavagem.

4.2.2 Isolamento das Arqueas

Alguns dos frascos do experimento 1, do biorreator 4, 1ª montagem com lodo armazenado em melhores condições de armazenamento, são mostrados na Figura 35. Realizou-se o isolamento de algumas colônias destes, por esgotamento, em Placas de Petri de plástico. Vale ressaltar que, na abertura dos frascos, não foi possível sentir o cheiro característico de metano, que era bastante expressivo na abertura dos biorreatores. Procurou-se isolar as colônias com diferentes morfologias. O crescimento nessas placas, após uma semana de cultivo, é mostrado na Figura 36.

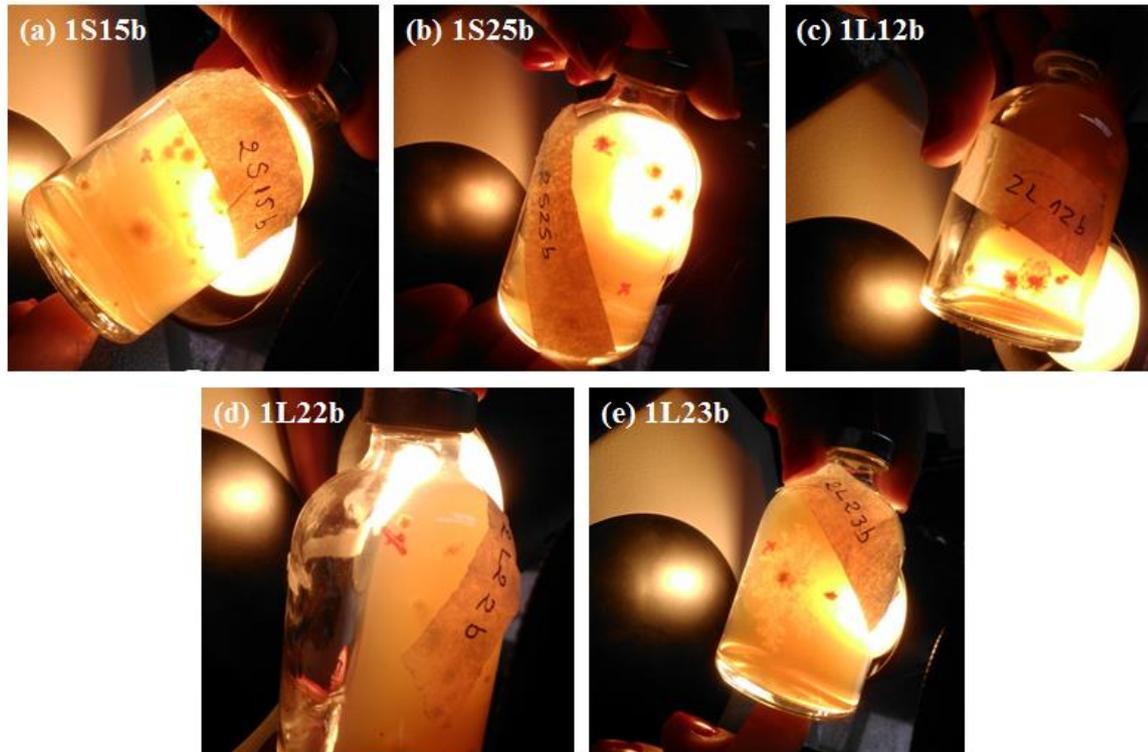


Figura 35. Frascos com formação de UFC provenientes do primeiro experimento de coleta de alíquotas de biomassa do biorreator 4 com três semanas de cultivo com indicação das colônias que seriam plaqueadas.

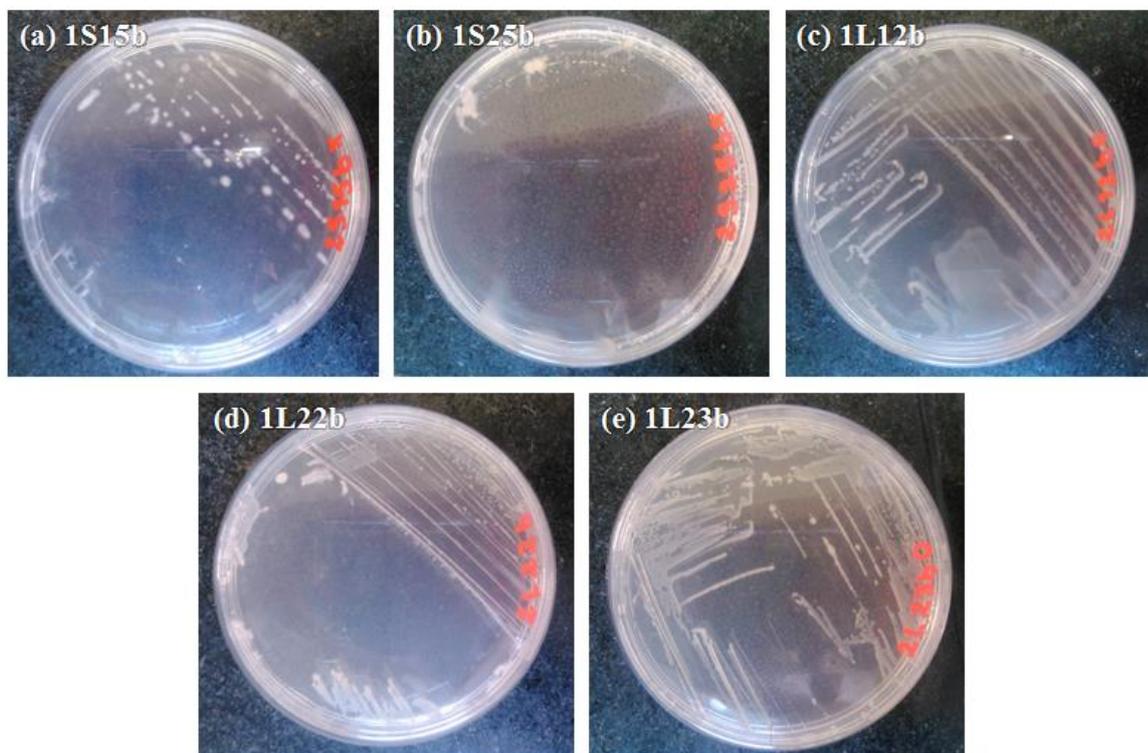


Figura 36. Crescimento das colônias isoladas dos frascos obtidos do primeiro experimento de coleta de alíquotas de biomassa do biorreator 4.

4.2.3 Coloração de Gram

Testes de coloração de Gram foram realizados nos cultivos, provenientes dos frascos 1S15b, 1S25b, 1L12b, 1L22b e 1L23b do experimento 1 de coleta, mostrados na Figura 36. O resultado da coloração, obtido através de visualização em microscópio ótico, é mostrado na Figura 37. Foram observados bastonetes com coloração Gram negativa, mas possuindo endósporos em todas as colônias isoladas, mesmo resultado obtido por Anjos *et al.* (2013). Estes microrganismos isolados correspondem a bactérias Gram positivas, apesar da coloração observada. Uma vez que todas as bactérias apresentando endósporos pertencem ao grupo Gram positivo. A coloração negativa é frequentemente observada nestes microrganismos, dependendo do tempo de crescimento e por algumas espécies serem consideradas Gram variáveis. As metanogênicas podem se apresentar com forma bastonetes e cocos e também como Gram-positivos e Gram-negativos, entretanto, não são esporuladas (WHITMAN *et al.*, 2006). Dessa forma, os microrganismos isolados não eram os de interesse, as arqueas metanogênicas.

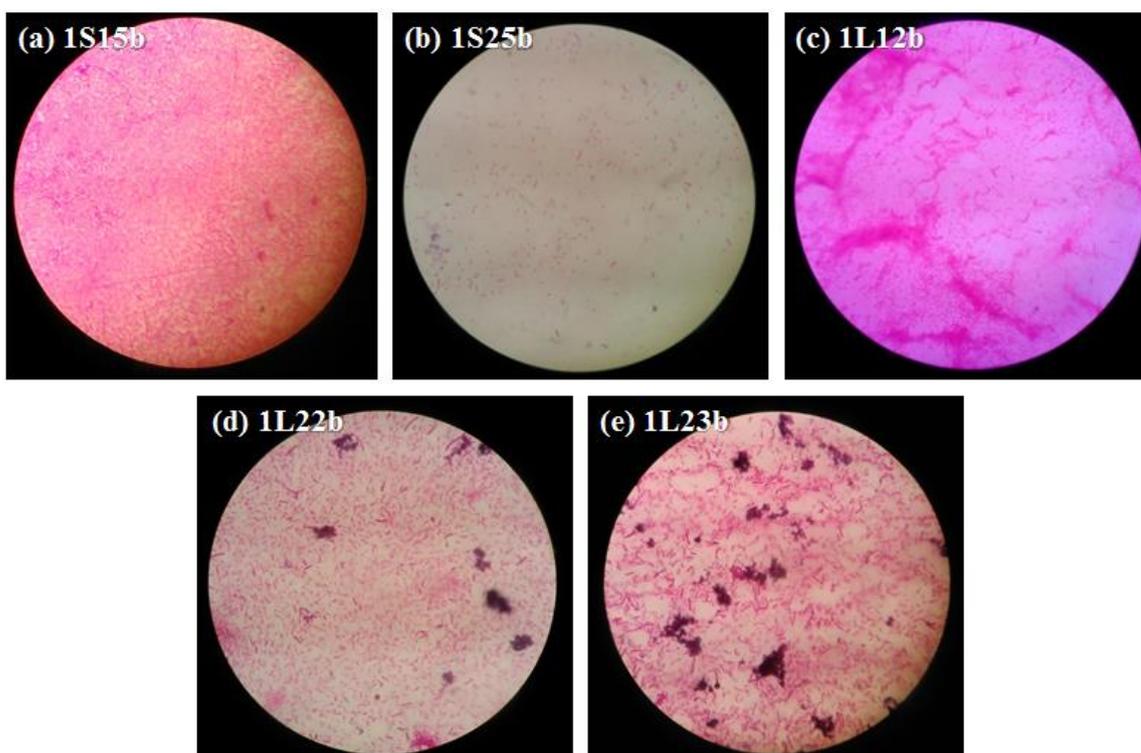


Figura 37. Visualização microscópica do resultado da coloração de Gram realizada dos isolamentos dos cultivos dos frascos obtidos do experimento 1 de coleta de alíquotas de biomassa.

Vinnerås *et al.* (2006) identificaram os microrganismos presentes em um sistema de biogás produzido a partir de resíduos orgânicos de um sistema de tubulação de gás natural. Os microrganismos que ele encontrou em forma de bastonetes com coloração Gram-positiva, que podem ser os microrganismos isolados (Figuras 36 e 37), foram: *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium spp.* e *Leucobacter acridicollis*.

4.2.4 Geração de Metano nos Frascos de Cultivo de Arqueas

Como as colônias coletadas dos frascos não apresentaram características de arqueas metanogênicas (não tinham cheiro característico de metano e apresentavam esporos), utilizou-se a análise cromatográfica dos frascos nos experimentos subsequentes para se verificar a presença dos microrganismos de interesse, as arqueas metanogênicas, através da verificação da presença de metano (CH₄) nestes frascos.

Os frascos do experimento 1 de coleta, provenientes da primeira diluição das duas coletas de biomassa realizadas da fase sólida precipitada, 1S11a, 1S11b, 1S21a e 1S21b apresentaram bolhas no seu interior, após três semanas de cultivo, como mostrado na Figura 38.

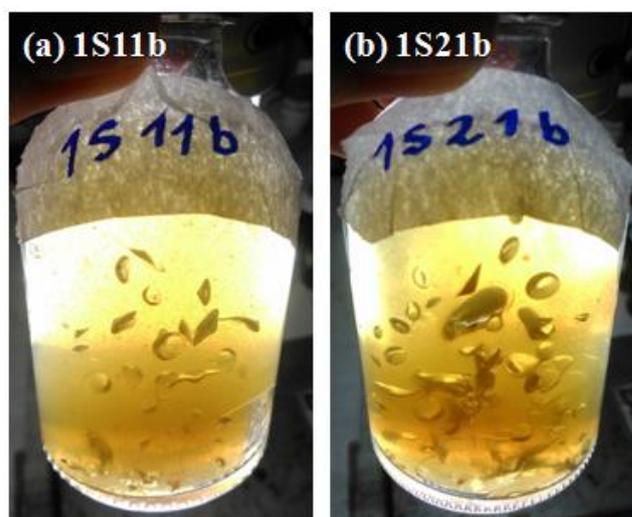


Figura 38. Frascos provenientes da primeira diluição das duas coletas de alíquotas de biomassa realizadas da fase sólida precipitada – Experimento 1 de coleta – com presença de bolhas no interior do meio de cultivo.

Realizaram-se análises cromatográficas desses frascos para se verificar a presença de metano (CH₄), com a coluna Porapak Q. Os percentuais de metano obtidos, após três semanas de cultivo, para cada um dos frascos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Percentuais de metano obtido, por análise cromatográfica com coluna Porapak Q, nos frascos provenientes da primeira diluição das duas coletas de alíquotas de biomassa da fase sólida precipitada – Experimento 1 de coleta – após 3 semanas de cultivo.

Frasco	Percentual de metano após 3 semanas de cultivo
1S11a	53,66%
1S11b	35,60%
1S21a	42,95%
1S21b	25,75%

As demais diluições do experimento 1 de coleta não apresentaram bolhas de gás no meio e as análises cromatográficas não mostraram a presença de metano em nenhum dos demais frascos. Esses frascos onde houve a formação de bolhas no interior do meio de cultivo, por estarem pouco diluídos, continham milhares de UFC, e, portanto, era impossível diferenciar colônias que propiciassem o isolamento seletivo de cada uma delas.

O frascos provenientes do experimento 2 e do experimento 3 de coleta não apresentaram metano (CH_4) nem formação de bolhas em nenhum de seus frascos. O experimento 4 de coleta dos biorreatores (meio com adição de agente microbiano), apresentou crescimento nos frascos provenientes da segunda diluição, 4S2a e 4S2b (Figura 39). Apesar da presença de colônias, nenhum destes frascos apresentou metano.

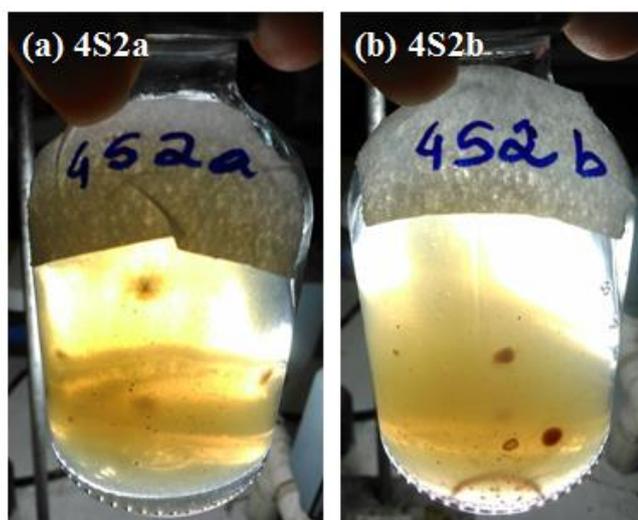


Figura 39. Frascos provenientes da segunda diluição do experimento 4 de coleta que apresentaram crescimento microbiano.

Como as alterações no meio (adição de lodo adensado e de agente antimicrobiano) não estavam apresentando resultados positivos para o crescimento de arqueas metanogênicas, realizou-se a coleta de biomassa do frasco que apresentou maior percentual de metano

(1S11a, proveniente da primeira diluição do experimento 1). Esse continha milhares de UFC, pois provinha de uma diluição menor e, a fim de se tentar isolar as arqueas metanogênicas presentes, retiraram-se alíquotas do próprio frasco (ao invés do biorreator) e repetiram-se as diluições em solução de elementos traços e a semeadura. O meio de cultura utilizado teve adição de lodo adensado, antes da autoclavagem, e antimicrobiano.

Das diluições a partir desse, a segunda diluição apresentou crescimento e formação de bolhas no seu meio (Figura 40). Por provir de diluições menores, ele continha milhares de UFC. E, embora ele tenha apresentado bolhas, as análises cromatográficas realizadas não apresentaram metano.



Figura 40. Frasco proveniente da segunda diluição do procedimento de coleta e de isolamento de biomassa coletada do frasco 1S11a com formação de bolhas.

Observa-se que a técnica de isolamento e o meio de cultivo utilizado possibilitaram o isolamento de microrganismos presentes no lodo. Entretanto, as condições utilizadas ainda não se mostraram adequadas para o isolamento de arqueas metanogênicas.

Capítulo 5

Conclusões

Neste capítulo, são apresentadas as conclusões e considerações finais desse trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

5.1 Conclusões e Considerações Finais

Após a avaliação dos resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior, chegaram-se as seguintes conclusões:

- Os ensaios de biodegradação mostraram-se viáveis para a avaliação da geração de biogás através da degradação dos resíduos e para a coleta de biomassa destes por apresentarem resultados relativamente rápidos de geração de biogás com alto teor de metano e pelos biorreatores apresentarem fácil abertura e acesso à biomassa. Entretanto, apresentaram o contraponto da abertura dos biorreatores interferir bruscamente no processo de digestão devido à entrada de oxigênio.
- Mesmo em condições de análises diferentes, os resultados obtidos para geração de biogás e de metano nos ensaios de biodegradação foram dentro do esperado quando comparados com os resultados obtidos por Priebe *et al.* (2013) e Kipper (2013), mostrando a sua reprodutibilidade.
- A influência do armazenamento prévio do lodo na biodegradação deste com farelo de couro *wet-blue* ainda não foi totalmente elucidada, devido à diferença de resultados de geração de biogás e de metano nas duas montagens realizadas dos ensaios de biodegradação. Entretanto, como um dos ensaios de biodegradação utilizados para

essa análise sofreu coleta de biomassa em sua fase de produção máxima (biorreator 7, 2ª montagem com lodo armazenado em condições ambientais), o que afetou bruscamente a sua geração de biogás, acredita-se que a forma de armazenamento do lodo sob condições ambientais (mantido à temperatura ambiente e sem vedação para a entrada de oxigênio) é a que apresenta maiores valores de geração de biogás e de metano. Ainda, é possível concluir que a forma de armazenamento prévio do lodo é um fator que influencia a produção total de biogás da biodegradação em volume, porém, não influencia a qualidade do biogás, de forma que o percentual de metano ao longo do processo é semelhante em todos os casos analisados, desconsiderando o que foi submetido à coleta de biomassa em fase de alta geração de biogás.

- A homogeneização do lodo se mostrou um fator de grande influência nos ensaios de biodegradação, tanto entre as duas montagens realizadas quanto entre as próprias duplicatas. Acredita-se que a dificuldade da sua homogeneização é um fator que contribui negativamente, pois possíveis pequenas diferenças de composição apresentam grandes diferenças nos resultados de geração de gás. Além disso, as diferenças de composição foram maximizadas pelo uso de quantidades relativamente pequenas de lodo (25 mL em cada ensaio de biodegradação).
- A influência do oxigênio na metanogênese, como esperado, através do que está descrito na literatura, não apresenta letalidade às arqueas metanogênicas quando estas estão em meio a um consórcio de microrganismos. Entretanto, acredita-se que em culturas puras, ele apresenta grande influência, pois não houve o isolamento dessas em cultura pura.
- A fase sólida precipitada nos biorreatores mostrou conter três ordens de grandeza a mais de unidades formadoras de colônia por mL do que a fase líquida sobrenadante.
- A disposição inicial do meio de cultivo utilizado em frascos tipo penicilina, ao invés de placas de Petri, se mostrou adequada para o cultivo, quantificação e isolamento de arqueas metanogênicas visto que a verificação da sua eficácia é de fácil visualização, pois há retenção dos gases gerados, podendo ser realizadas análises cromatográficas, e há formação de bolhas dentro do meio de cultivo, devido aos gases gerados, embora somente a formação de bolhas não seja suficiente para confirmar a geração de metano, como mostrado pelo frasco cultivado (V21) que apresentou bolhas, mas não

apresentou metano nas análises cromatográficas. Ainda, não é possível saber se há formação de bolhas em culturas de arqueas metanogênicas mais diluídas. Dessa forma, a cromatografia gasosa deve sempre ser utilizada para verificação.

- A adição de lodo no meio de cultivo, antes da sua autoclavagem, para simular condições similares às do biorreator, diferentemente do esperado, não apresentou influência significativa, visto que o número de UFC formadas nos frascos com e sem lodo foi semelhante. Há a possibilidade da autoclavagem do lodo, junto com o meio de cultivo, tenha degradado os nutrientes.
- Foram observados bastonetes Gram-positivos com endósporos nos microrganismos isolados, não sendo, portanto, arqueas metanogênicas.
- A exposição das arqueas metanogênicas ao ar atmosférico durante o processo de diluição ainda não foi totalmente elucidada quanto à sua letalidade, pois houve crescimento de arqueas metanogênicas, comprovado pela geração de metano detectada, apenas nos frascos das primeiras diluições realizadas. Esse crescimento, apenas nesses frascos, pode ser devido ou a presença do consórcio de microrganismos ou a não resistência das arqueas metanogênicas à exposição ao ar nas diluições realizadas subsequentemente.
- A técnica de isolamento com a utilização de frascos de penicilina se mostrou adequada para a quantificação de microrganismos metanogênicos presentes nos ensaios de biodegradação, embora ainda não esteja totalmente elucidada quanto ao isolamento das arqueas metanogênicas.

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

- Proposta de design de biorreatores em que seja possível a coleta frequente de biomassa sem intervenção significativa no processo, de modo que não seja necessária a sua abertura.
- Realização do procedimento de coleta e isolamento de biomassa em uma câmara de anaerobiose.
- Teste de outros meios de cultivo específicos para arqueas metanogênicas.

- Identificação dos microrganismos presentes na biomassa coletada dos ensaios de biodegradação, pois mesmo não sendo metanogênicos certamente podem contribuir com a instalação das condições anaeróbias, exigidas por estas arqueas.
- Coloração de endósporos nos isolamentos obtidos.
- Utilização de técnicas de homogeneização mais efetivas do lodo adensado antes de sua adição aos ensaios de biodegradação.
- Ensaio de biodegradação com adição de inóculos dos microrganismos isolados.
- Testes de biodegradação de outros resíduos sólidos da indústria coureira, tais como couros curtidos com taninos vegetais e sintéticos, couros acabados, entre outros.
- Escalonamento dos biorreatores para escala piloto.

Referências Bibliográficas

ADU-GYAMFI, N.; RAVELLA, S. R.; HOBBS, P. J. Optimizing anaerobic digestion by selection of the immobilizing surface for enhanced methane production. *Bioresource Technology*, 120, 248-255, 2012.

ANDREOLI, C, V.; SPERLING, M. V.; FERNANDES, F. *Lodo de esgotos: tratamento e disposição final*. ISBN: 85-88556-01-4. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. Companhia de Saneamento do Paraná, 2001.

ANDRIOLI, E.; GUTTERRES, M. Processos alternativos ao tratamento dos resíduos sólidos gerados pela indústria coureiro-calçadista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis, *Anais...* Brasil, 2013.

ANJOS, P. S.; PRIEBE, G. P. S.; CORCAO, G.; SOARES,; GUTERRES, M. Isolation, characterization and effects of inhibitors on bacteria producing biogas from tannery sludge. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL UNION OF LEATHER TECHNOLOGISTS AND CHEMISTS SOCIETIES, 32, 2013, Istambul. *Anais...* Istambul, 2013.

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

AQUIM, P. M. Gestão em curtumes: uso integrado e eficiente da água. 146 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Optimization of biogas production from waste activated sludge through serial digestion. *Renewable Energy*, 47, 147-151, 2012.

BACIOCCHI, R.; CARNEVALE, E.; CORTI, A.; COSTA, G.; LOMBARDI, L.; OLIVIERI, T.; ZANCHI, L.; ZINGARETTI, D. Innovative process for biogas upgrading with CO₂ storage: results from pilot plant operation. *Biomass and Bioenergy*, 30, 1-10, 2012.

BISWAS, J.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Kinetic studies of biogas generation using municipal waste as feed stock. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 493-503, 2006.

BOND, T.; TEMPLETON, M. R. History and future of domestic biogas plants in the developing world. *Energy for Sustainable Development*, 15, 347-354, 2011.

BRASIL. Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM. Dispõe sobre o controle da disposição final de resíduos Classe I com características de inflamabilidade no solo, em sistemas de destinação final de resíduos denominados “aterro de resíduos classe I” e “central de recebimento e destinação de resíduos classe I”, no âmbito do Estado do Rio Grande do Sul. Portaria n. 016/2010, de 20 de abril de 2010. **Lex:** Diário Oficial do Estado. 26/04/2010.

BRASIL. Lei n. 12305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Lex:** Diário Oficial da União. Seção 1. 03/08/2010. p. 3.

BROCHIER-ARMANET, C.; FORTERRE, P.; GRIBALDO, S. Phylogeny and evolution of the archaea: one hundred genomes later. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 274-281, 2011.

CARRÈRE, H.; DUMAS, C.; BATTIMELLI.; BATSTONE, D. J.; DELGENÈS, J. P.; STEYER, J. P.; FERRER, I. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 183, 1-15, 2010.

CHEN, Y.; CHENG, J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 99, 4044-4064, 2008.

CICB, Centro das indústrias de curtumes do Brasil. Disponível na internet: http://www.cicb.org.br/?page_id=6369. Acesso em 12/10/2014.

COELHO, R. R. R.; PEREIRA, A. F.; SOUTO-PADRON, T.; VERMELHO, A. B. *Práticas de Microbiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006 il. 256 p.

CORTES, H. J.; WINNIFORD, B.; LUONG, J.; PURSCH, M. Comprehensive two dimensional gas chromatography review. *Journal of Separation Science*, 32, 883-904, 2009.

DANG, Y.; YE, J.; MU, Y.; QIU, B.; SUN, D. Effective anaerobic treatment of fresh leachate from MSW incineration plant and dynamic characteristics of microbial community in granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 10563-10574, 2013.

DETTMER, A. Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microrganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro. 115 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

DHAYALAN, K.; FATHIMA, N. N.; GNANAMANI, A.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Biodegradability of leathers through anaerobic pathway. *Waste Management*, 27, 760-767, 2007.

DIETZ, W. A. Response factors for gas chromatographic analyses. *Journal of Chromatographic Science*, 5 (2), 68-71, 1967.

DONOSO-BRAVO, A.; MAILIER, J.; MARTIN, C.; RODRÍGUEZ, J.; ACEVES-LARA, C. A.; WOUWER, A. V. Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: a review. *Water Research*, 45, 5347-5364, 2011.

DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. 2 ed. Academic Press Ltd., London, 1997.

DORMAN, F. L.; WHITING, J. J.; COCHRAN, J. W.; GARDEA-TORRESDEY, J. Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, 82, 4775-4785, 2010.

EL-SHEIKH, M. A.; SALEH, H. I.; FLORA, J. R.; ABDEL-GHANY, M. R. Biological tannery wastewater treatment using two stage UASB reactors. *Desalination*, 276, 253-259, 2011.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, e6, 2013.

GUŠTIN, S.; MARINŠEK-LOGAR, R. Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent. *Process Safety and Environmental Protection*, 89, 61-66, 2011.

GUTTERRES, M.; MELLA, B. Chromium in Tannery Wastewater. In: SHARMA, S. *Heavy metals in water: presence, removal and safety*. PDF eISBN: 978-1-78262-017-4, 2015.

HJORTH, M.; GRÄNITZ, K.; ADAMSEN, A. P. S.; MØLLER, H. G. Extrusion as a pretreatment to increase biogas production. *Bioresource Technology*, 102, 4989-4994, 2011.

JENNINGS, W.; MITTFELDELT, E.; STREMPLE, P. *Analytical Gas Chromatography*. 2 ed. 389 p. Academic Press. 1997.

KAMESWARI, K. S. B.; KALYANARAMAN, C.; PORSELVAM, S.; THANASEKARAN, K. Enhancement of biogas generation by addition of lipase in the co-digestion of tannery solid wastes. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 39(8), 781-786, 2011.

KAMPMANN, K.; RATERING, S.; BAUMANN, R.; SCHMIDT, M.; ZERR, W.; SCHNELL, S. Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 404-413, 2012.

KAPARAJU, P.; SERRANO, M.; ANGELIDAKI, I. Optimization of biogas production from wheat straw stillage in UASB reactor. *Applied Energy*, 87, 3779-3783, 2010.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, 31, 1737-1744, 2011.

KIPPER, E. Tratamento enzimático e produção de biogás por resíduos sólidos de curtumes. 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

LASTELLA, G.; TESTA, C.; CORNACCHIA, G.; NOTORNICOLA, M.; VOLTASIO, F.; SHARMA, V. K. Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. *Energy Conversion and Management*, 43, 63-75, 2002.

LI, Y.; PARK, S. Y.; ZHU, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 821-826, 2011.

LIU, D. S.; LI, Z. G.; WANG, Z. S.; PAN, Y. H. An unified model for the different phases of growth of microbial populations in a closed system. *Ecological Modelling*, 82, 193-198, 1995.

LIU, X.; GAO, X.; WANG, W.; ZHENG, L.; ZHOU, Y.; SUN, Y. Pilot-scale anaerobic co-digestion of municipal biomass waste: focusing on biogas production and GHG reduction. *Renewable Energy*, 44, 463-468, 2012.

LÓPEZ, M. J.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, J.; BOTHAST, R. J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 125-131, 2004.

MATA-ALVAREZ, J.; MACÉ, S.; LLABRÉS, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74, 3-16, 2000.

MEESTER, S. D.; DEMEYER, J.; VELGHE, F.; PEENE, A.; LANGENHOVE, H. V.; DEWULF, J. The environmental sustainability of anaerobic digestion as a biomass valorization technology. *Bioresource Technology*, 121, 396-403, 2012.

MELLA, B. Remoção de cromo de banhos residuais de curtimento através de precipitação química e eletrocoagulação. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –

Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MISSIAGGIA, R. R. Gestão de resíduos sólidos industriais: caso Springer Carrier. 119 p. Dissertação (Mestrado em Administração) – Programa de Pós-graduação em Administração, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

MØLLER, H. B.; SOMMER, S. G.; AHRING, B. K. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy*, 26, 485-495, 2004.

NARIHIRO, T.; SEKIGUCHI, Y. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 273-278, 2007.

PACE, N. R. Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, n° 4, 565-576, 2009.

PASSOS, J. B. Reúso de água: uma proposta de redução do consumo de água em curtumes. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

PAZINATO, J. M.; PAULO, E. N.; MENDES, L. W.; VAZOLLER, R. F.; TSAI, S. M. Molecular characterization of the archaeal community in a amazonian wetland soil and culture-dependent isolation of methanogenic archaea. *Diversity*, 2, 1026-1047, 2010.

PICCIN, J. S. Resíduo sólido da indústria coureira como adsorvente alternativo de corantes. 169 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

PICCIN, J. S.; GOMES, C. S.; FERIS, L. A.; GUTTERRES, M. Kinetics and isotherms of leather dye adsorption by tannery solid waste. *Chemical Engineering Journal*, 183, 30-38, 2012.

PIEROBON, L. R. P. Sistema de geração de energia de baixo custo utilizando biogás proveniente de aterro sanitário. 139 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) –

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

PINTO, D. P. S. Contribuição à avaliação de aterros de resíduos industriais. 145 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

PRIEBE, G. P. S.; MARCÍLIO, N. R.; KIPPER, E.; GUSMÃO, A.; SOARES, M. G. Biogas production from leather industry wastes. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL UNION OF LEATHER TECHNOLOGISTS AND CHEMISTS SOCIETIES, 32, 2013, Istambul. *Anais...* Istambul, 2013.

QIAO, W.; YAN, X.; YE, J.; SUN, Y.; WANG, W.; ZHANG, Z. Evaluation of biogas production from different biomass wastes with/without hydrothermal pretreatment. *Renewable Energy*, 36, 3313-3318, 2011.

RASI, S.; LÄNTELÄ, J.; RINTALA, J. Trace compounds affecting biogas energy utilisation – a review. *Energy Conversion and Management*, 52, 3369-3375, 2011.

SASAKI, D.; HORI, T.; HARUTA, S.; UENO, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Methanogenic pathway and community structure in a thermophilic anaerobic digestion process of organic solid waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, n° 1, 41-46, 2011.

SHANMUGAM, P.; HORAN, N. J. Optimising the biogas production from leather fleshing waste by co-digestion with MSW. *Bioresource Technology*, 100, 4117-4120, 2009.

SILVA, C. R. Áreas potenciais para o aterro de resíduos sólidos industriais alasse II A: o caso do município de Osório/RS. 182 p. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Programa de Pós-graduação em Geografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

SINGH, L. S.; MAZUMDER, P. B. Differential approaches for studying methanogens: methods, analysis and prospects. *Assam University Journal of Science & Technology: Biological and Environmental Sciences*, 1, vol. 6, 123-128, 2010.

STEPHEN, D.; FLICKINGER, M. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. John Wiley, 1999.

THANGAMANI, A.; RAJAKUMAR, S.; RAMANUJAM, R. A. Anaerobic co-digestion of hazardous tannery solid waste and primary sludge: biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 12, 517-524, 2010.

THOMPSON, J. M.; STEPHEN, W. I. The gas chromatographic separation of anaesthetic agents and aerosol propellants in operating room air using serially packed columns. *Analytica Chimica Acta*, 178, 341-345, 1985.

TOCCHETTO, M. R. L.; SOARES, M. R. K. O gerenciamento de resíduos sólidos industriais. Programa de Desenvolvimento de Recursos Humanos. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre, Edição Revisada, 2003.

VINNERÅS, B.; SCHÖNNING, C.; NORDIN, A. Identification of the microbiological community in biogas systems and evaluation of microbial risks from gas usage. *Science of the Total Environment*, 367, 606-615, 2006.

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The Methanogenic Bacteria. *Prokaryotes*, 3, 165-207, 2006.

WISZNIOWSKI, J.; ROBERT, D.; SURMAEZ-GORSKA, J.; MIKSCH, K.; WEBWE, J. V. Landfill leachate treatment methods: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 51-61, 2006.

ZUPANČIČ, G. D.; JEMEC, A. Anaerobic digestion of tannery waste: semi-continuous and anaerobic sequencing batch reactor processes. *Bioresource Technology*, 101, 26-33, 2010.

Anexo I

***Isolamento de Arqueas e Bactérias Anaeróbias em Meios Residuais de Curtumes* publicado no COBEQ – XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**

ISOLAMENTO DE ARQUEAS E BACTÉRIAS ANAERÓBIAS EM MEIOS RESIDUAIS DE CURTUMES

C. B. AGUSTINI¹, W. L. D. NETO¹, G. P. S. PRIEBE¹, M. COSTA², M. GUTTERRES¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
E-mail para contato: caroline.agustini@ufrgs.br

RESUMO – A indústria coureira tem grande importância econômica. Entretanto, a sobra de resíduos do processo e a crescente importância da geração de energia a partir de fontes renováveis faz com que seja necessário estudar formas de biodegradação dos resíduos e gerar energia a partir disso. O presente trabalho tem como objetivo realizar o isolamento e a identificação dos procariotos anaeróbios, alguns com potencial para a produção de biogás quando degradam resíduos de curtume. Para tanto, foram realizados testes em biorreatores de bancada contendo lodo de estação de tratamento de efluente de curtume e farelo de couro *wet-blue* e a geração de metano foi medida periodicamente, onde a produção máxima foi na sexta semana de experimento com média de 10 mL de geração diária de gás. Quando a produção de metano foi máxima, foi feita a coleta destes microrganismos anaeróbios para subsequente isolamento e identificação.

1. INTRODUÇÃO

A crescente importância da geração de energia a partir de fontes alternativas devido às altas taxas de poluição e sérios impactos ambientais causados pelas fontes tradicionais tornou as fontes de energias renováveis uma alternativa muito estudada atualmente. A geração de energia a partir de fonte renovável permite a reciclagem da matéria existente na natureza, renovando-a continuamente. São exemplos de energia renovável: recursos hídricos, energia eólica, energia solar, geotérmica, biomassa, entre outras. Define-se como biomassa todo recurso renovável proveniente de matéria orgânica, animal ou vegetal, sendo que a biomassa pode ser utilizada na produção de energia.

A indústria coureira tem grande importância onde está inserida. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de couro sendo responsável por 13% da produção mundial. Entretanto, o processo de curtimento gera quantidades significativas de resíduos sólidos e líquidos com altos teores de poluentes, devido aos produtos tóxicos usados durante o processo, tais como, sulfato básico de cromo e sulfeto de sódio (DETTMER, 2012).

Em um curtume, cada pele processada gera, em média, 12 kg de lodo residual com características variadas devido ao tipo de pele, à tecnologia no processamento, ao sistema empregado na estação de tratamento de efluente – ETE, entre outros fatores (SOUZA, 2009). Os lodos de ETEs são, em sua grande maioria, destinados a aterros de resíduos industriais perigosos – ARIPs. Aterros são obras de engenharia projetadas sob critérios técnicos, cuja finalidade é garantir a disposição dos resíduos sólidos sem causar danos à saúde pública e ao meio ambiente. Os ARIP's podem ser descritos como grandes reatores anaeróbios que geram, a partir da estabilização da matéria orgânica, os seguintes subprodutos: gases (CH₄, CO₂, NH₃, entre outros), líquidos

(chorume) e, ainda, matéria sólida remanescente (BIDONE, 2007).

A digestão anaeróbia é um processo biológico onde o consórcio de diferentes microrganismos, na ausência de oxigênio molecular, promove a transformação de compostos orgânicos complexos em produtos mais simples, tais como metano (QUADROS, 2009). O biogás é o produto da decomposição, pelas arqueas, de matéria orgânica proveniente de diferentes fontes, como aterros sanitários, biodigestores e resíduos animais.

A partir desses conceitos, esse trabalho propõe incubar lodo proveniente de aterros de curtumes em biorreatores de bancada com a finalidade de coletar e isolar os microrganismos que apresentam potencial de produzirem biogás.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Biorreatores em Escala de Bancada

O cultivo dos microrganismos produtores de metano capazes de degradar resíduos de curtumes foi realizada em biorreatores de bancada. Esses biorreatores são feitos de vidro, com volume útil de 350 mL, e foram mantidos em um banho termostático a 35°C. Eles possuem duas válvulas de abertura, uma superior, utilizada para a medida de volume de gás produzido, e uma lateral, utilizada para a retirada de amostras para análise cromatográfica.

A montagem dos 6 biorreatores, baseada nos resultados obtidos por Priebe *et al.* (2013), foi realizada adicionando-se, em cada biorreator, 1 g de farelo de rebaixamento (ajuste de espessura) de couro *wet-blue* (couro curtido com cromo), como fonte de matéria orgânica a ser degradada, 25 mL de lodo ativado adensado, coletado de uma estação de tratamento aeróbio de um curtume que utiliza sais de cromo como agente de curtimento e, para assegurar condições favoráveis para o crescimento dos microrganismos, 250 mL uma solução de nutrientes, descrita por Dettmer *et al.* (2012).

Os experimentos foram realizados em duplicata, onde a diferença entre eles era a forma de armazenamento do lodo, por aproximadamente 6 meses antes do início dos experimentos. Nos biorreatores 1 e 2, o lodo foi armazenado em temperatura ambiente e sem vedação para a entrada de O₂. Nos biorreatores 3 e 4, o lodo foi armazenado na geladeira e com vedação para a entrada de O₂. Nos biorreatores 5 e 6, o lodo foi armazenado em temperatura ambiente, com vedação para a entrada de O₂ e 100 g de colágeno hidrolisado foram previamente adicionados em aproximadamente 1 L de lodo como fonte de material orgânico prontamente disponível.

2.2. Medidas de Volume de Gás Gerado

O volume total de gás gerado foi medido diariamente através de um aparato (Figura 1) baseado no deslocamento de volume de água através de equalização de pressões.



Figura 1 – Disposição dos instrumentos para realização da medida de volume total de gás gerado.

Para a realização da medida, a mangueira era conectada no biorreator na sua abertura superior. A válvula do aparato era aberta para aliviar a pressão remanescente, sendo então a água que saía nesse momento descartada. A válvula do biorreator era aberta liberando um volume de água pelo aparato equivalente ao volume de gás gerado no biorreator. Esse volume de água era pesado e convertido em volume através da massa específica da água na temperatura da sala no momento da medida.

2.3. Análise dos Gases Gerados por Cromatografia Gasosa

Para a determinação da composição dos gases gerados nos biorreatores, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (GC) equipado com um detector de condutividade térmica (TCD). Duas colunas empacotadas foram utilizadas, Porapak Q e Peneira Molecular. A primeira, Porapak Q (80-100 mesh), determinava a fração entre ar ($O_2 + N_2$), metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). A outra, Peneira Molecular (80-100 mesh), determinava a proporção entre O_2 e N_2 no ar. As condições de análise, são descritas por Priebe *et al.* (2013). As medidas foram realizadas semanalmente para monitoramento da produção de gás.

2.4. Coleta dos microrganismos

Após 118 dias de experimento, amostras foram coletadas. Como os microrganismos de interesse, os metanogênicos, são estritamente anaeróbios (Whitman, 2006), todo o procedimento de coleta foi planejado de forma que a sua exposição ao ar atmosférico fosse mínima.

Primeiramente, o biorreator de maior produção de biogás, reator 2, foi aberto e foram retiradas alíquotas de 0,2 mL do líquido e 0,2 mL da fase sólida. Cada uma das alíquotas, tanto do líquido quanto do sólido, foram colocadas em frascos tipo penicilina com 20 mL de uma solução de minerais (Whitman, 2006). Foram realizadas 4 diluições-centesimais. De cada uma das diluições, transferiu-se uma alíquota de 0,1 mL para o meio anaeróbio (Whitman, 2006), em duplicata, também dispostos em frascos tipo penicilina com 20 mL cada, previamente dissolvidos e mantidos a 58° C. Algumas modificações foram feitas: foi utilizado ágar 2%, retirada a solução de sulfeto, e o meio foi disposto inclinado. Não foram adicionado gases (H_2 , N_2 e CO_2) neste experimento.

Com exceção da extração feita do sólido precipitado com uma agulha longa, agulha Raquidiana BD Spinal™ (código: 405211), todas as transferências de soluções foram feitas o

mais rápido possível com auxílio de seringa de insulina, com agulha simples. Todas as inoculações foram feitas com os frascos fechados (tampa de borracha), perfurando-se a borracha, com o meio de cultura ainda líquido.

Após cada diluição, os frascos eram homogêneos lentamente e posicionados na posição inclinada, até solidificação. A incubação foi feita a 35°C, mesma condição de temperatura dos biorreatores.

Para controle do ensaio utilizou-se a *Escherichia coli* (ATCC 10145) e *Pseudomonas aeruginosa* (cepa ambiental) como controle positivo e negativo para anaerobiose respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Volumes de gases gerados

Volume total de gás gerado: O volume de gás total gerado, medido por 118 dias, é mostrado na Figura 2.

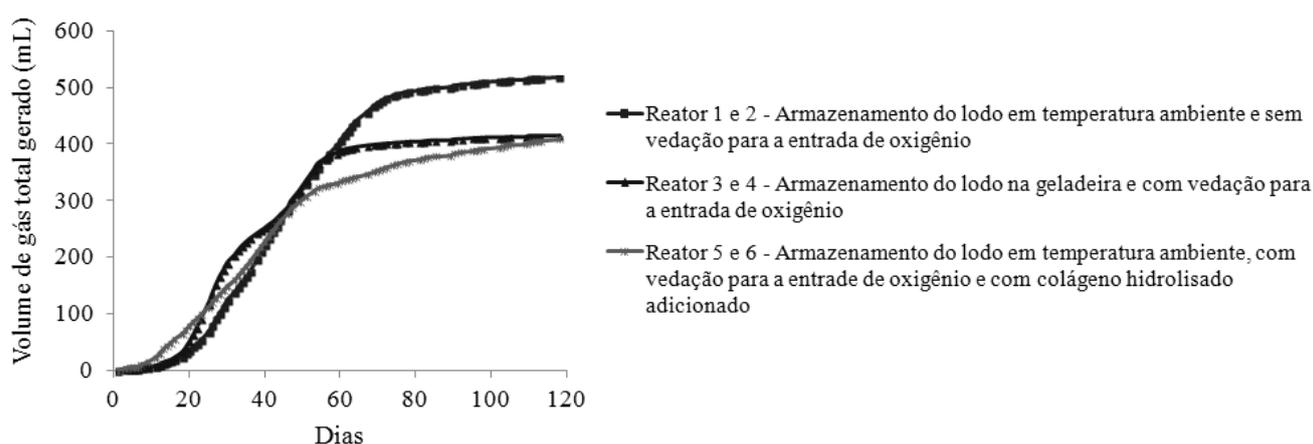


Figura 2 – Média do volume total de gás gerado de cada duplicata.

O comportamento das curvas é característico de crescimento em meios fechados e os valores obtidos foram dentro do esperado, quando comparados com os valores obtidos por Priebe, *et al.* (2013). A duplicata 1 e 2, com lodo armazenado em temperatura ambiente e sem vedação para a entrada de O₂, que teve a maior produção de gás, mostrou um comportamento atípico do reator 1, que teve um crescimento inicial muito lento, porém um crescimento subsequente muito acelerado, de forma que, ao fim do experimento, os dois reatores obtiveram quantidades semelhantes de volume total de gás gerado. A duplicata 3 e 4, com lodo armazenado na geladeira e com vedação para a entrada de O₂, segunda a ter maior produção, também mostrou um comportamento atípico no reator 4, que, ao final do experimento, cessou a produção muito antes que o 3, devido, provavelmente, a alguma falha na sua montagem. Entretanto, mesmo com o desempenho baixo do reator 4, a média dessa duplicata ainda ficou maior que a duplicata 5 e 6, com lodo armazenado em temperatura ambiente, com vedação para a entrada de O₂ e com colágeno hidrolisado adicionado, que foi a mais similar entre as duplicatas e a que menos produziu gás.

Cromatogramas: Exemplos de cromatogramas gerados para uma amostra no início do experimento são mostrados na Figura 3. Eles mostram grande quantidade de ar dentro do biorreator e pouca quantidade de metano e gás carbônico.

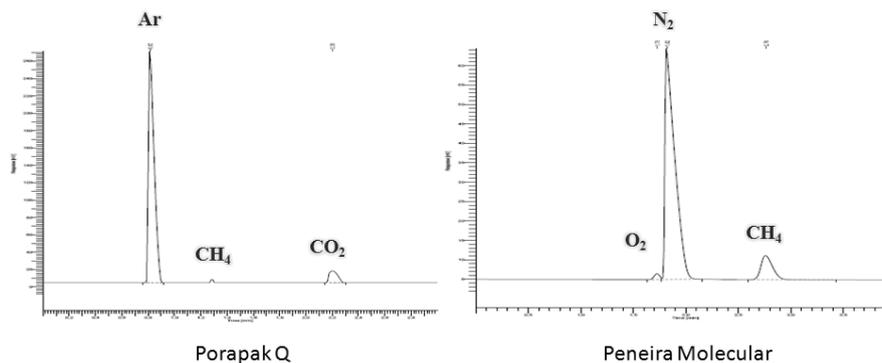


Figura 3 – Exemplos de cromatogramas gerados na segunda semana de experimento em $\mu\text{V} \times \text{s}$.

Exemplos de cromatogramas gerados para uma amostra no final do experimento são mostrados na Figura 4. Eles mostram uma quantidade ínfima de ar e grande quantidade de metano.

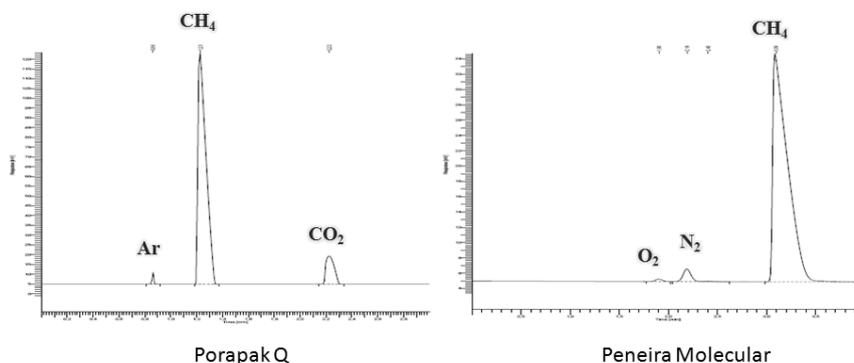


Figura 4 – Exemplos de cromatogramas gerados na décima quinta semana de experimento em $\mu\text{V} \times \text{s}$.

Volume de metano gerado: A partir dos valores das áreas dos picos obtidos na cromatografia, foi possível estimar a quantidade de metano gerada ao longo do processo. Primeiramente, dividiram-se todas as áreas obtidas por fatores de resposta obtidos por Dietz (1967), necessários para se obter a resposta real das quantidades presentes no biorreator (Priebe, 2013).

Com as novas áreas obtidas, levou-se em consideração apenas o percentual entre elas. O tempo do pico não foi rigorosamente considerado devido a sua grande sensibilidade à introdução da amostra no equipamento e ao estado do septo de borracha presente no local de introdução da amostra.

Para o cálculo da porcentagem de metano, considerou-se apenas a proporção da área obtida na Porapak Q, pois o pico referente ao metano na Peneira Molecular não consegue separar eficientemente o CO_2 do metano, o que acabaria amplificando esse sinal caso o percentual de metano fosse dali obtido. A Peneira Molecular serviu apenas para acompanhar a quantidade de oxigênio dentro do biorreator, que, caso não decrescesse, acusaria um possível vazamento.

Uma vez obtido o percentual de metano nos dias em que se realizou a cromatografia, estimou-se um comportamento linear entre cada um dos dias de cromatografia, e pode-se estimar o percentual de metano nos dias em que não se realizou a medida. Multiplicou-se esse percentual

pelo volume de gás total obtido em cada dia e as curvas obtidas, com comportamento semelhante às curvas de gás total gerado, são mostradas na Figura 5,

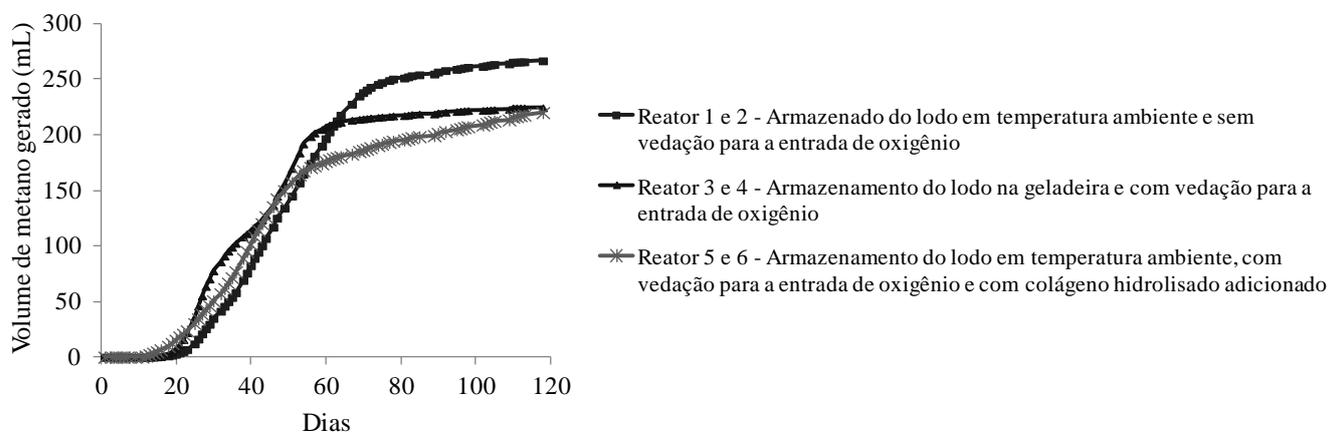


Figura 5 – Média do volume de metano gerado de cada duplicata.

3.2. Crescimento dos microrganismos

Após três semanas de incubação, foi observado crescimento microbiano, onde algumas unidades formadoras de colônia (UFC) são mostradas na Figura 6. A pouca quantidade de colônias após tanto tempo de cultivo mostra que o meio é bastante seletivo para os microrganismos de interesse, os metanogênicos, que apresentam crescimento lento (Whitman, 2006). Além disso, não foi observado nenhum crescimento na superfície do meio, em contato com o ar, mostrando novamente a seletividade do meio e que a presença de oxigênio não afetou o crescimento no interior do meio, mostrando que ele é um meio bastante redutor. Ainda, a *E. coli* apresentou crescimento e a *P. aeruginosa* não cresceu, dentro do esperado.



Figura 6 – Exemplo de frasco da segunda diluição (1/10.000) com amostra extraída do sólido precipitado com UFC indicadas após 3 semanas de cultivo.

A contagem média de UFC após 3 semanas de incubação resultou em $38,5 \cdot 10^5$ UFC/mL da fase sólida e em $5 \cdot 10^5$ UFC/mL da fase líquida do biorreator.

4. CONCLUSÕES

Como já comprovado por Priebe *et al.* (2013), o cromo não é inibidor dos microrganismos. A produção de gás, especialmente de metano, comprovada pela cromatografia, mostra que há atividade metanogênica mesmo na presença desse mineral.

A forma de armazenamento do lodo que se mostrou mais adequada, diferente do esperado, foi em temperatura ambiente sem a vedação para a entrada de O₂. Acredita-se que a entrada de O₂ não foi um fator que contribuiu, pois a difusão do oxigênio é ineficiente independente da temperatura, assim o lodo mantém-se em anaerobiose, condição necessária para o crescimento dos microrganismos de interesse. Já quanto a temperatura de armazenamento, acredita-se que manter os microrganismos em baixas temperaturas retardou a sua adaptação aos biorreatores.

A adição de colágeno favoreceu a adaptação dos microrganismos nos biorreatores, pois a geração de gás foi maior no início dos experimentos com esse lodo. Isso era esperado devido ao fato do colágeno puro ser mais fácil de degradar do que o presente no *wet-blue*. Entretanto, com o decorrer do experimento, não se mostrou a forma que mais produziu metano. O motivo disso ainda será estudado.

O método de isolamento, com relação ao ambiente anaeróbio, mostrou-se eficiente, pois não houve crescimento da *P. aeruginosa*, demonstrando a ausência de O₂ disponível no frasco.

A continuidade do trabalho se dará com as seguintes mudanças no método apresentado: retirar os microrganismos na sua fase de crescimento máximo a partir de novos ensaios de biorreatores em escala de bancada, utilizar atmosfera com CO₂ e N₂ para assegurar ainda mais a anaerobiose e utilizar os lacres de alumínio nos frascos de penicilina desde o momento de preparação dos frascos, evitando perda de gases. Identificar os principais grupos de microrganismos isolados utilizando o método de PCR e sequenciamento utilizando o gene do RNA16S.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro do CNPq (Edital UNIVERSAL – MCTI/CNPq N° 14/2010 e N° 14/2013) e da FAPERGS (Edital 04/2012 Programa Pesquisador Gaúcho – PqG e Edital FAPERGS/CAPES 17/2012 Programa de Bolsa de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial para Centros e Laboratórios Multiusuários).

6. REFERÊNCIAS

BIDONE, R. F.; HARTMANN, F.; ROSA, A. L.; SOUTO, G. D. B.; POVINELLI, J. Filtros anaeróbios aplicados ao tratamento de lixiviado de aterros sanitários. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, 2007, Rio de Janeiro, Anais.

DETTMER, A. Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microrganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro. Tese de Doutorado, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2012.

DIETZ, W. A. Response factors for gas chromatographic analyses. *Journal of Chromatographic Science*. 5 (2): 68-71, 1967.

PRIEBE, G. P. S.; MARCÍLIO, N. R.; GUSMÃO, A. L.; KIPPER, E.; GUTTERRES, M. Biogas production from leather industry wastes. In: INTERNATIONAL UNION OF LEATHER TECHNOLOGISTS AND CHEMISTS SOCIETIES, 32, 2013, Istanbul, Anais.

QUADROS, A. V. Avaliação da remoção de matéria orgânica carbonácea em filtros anaeróbios tratando lixiviado de resíduos sólidos urbanos. Dissertação de Mestrado, UNISINOS, RS, Brasil, 2009.

SOUZA, M. R. F. Uso do lodo de curtume como fonte de nutrientes em plantas forrageiras. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária, UFG, GO, Brasil, 2009.

WHITMAN, W. B.; BOWEN T. B.; BOONE D. R. *Prokaryotes*. DOI: 10.1007/0-387-30743-5_9. 3:165–207, 2006.

Anexo II

Influence of Sludge Tannery Waste Storage Conditions in Biogas Production submetido na **Brazilian Journal of Chemical Engineering (BJCE)**

INFLUENCE OF SLUDGE TANNERY WASTE STORAGE CONDITIONS IN BIOGAS PRODUCTION

C. Agustini¹, W. Neto¹, G. Priebe¹, M. Costa², M. Gutterres¹

Federal University of Rio Grande do Sul,

¹Chemical Engineering Department, LACOURO, Rua Eng. Luiz Englert, P. 12204, CEP 90040-040 Porto Alegre – RS, Brasil.

²Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Bacteriology Laboratory, ICBS, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre – RS, Brasil.

E-mail: caroline.agustini@ufrgs.br

Abstract - The study presents an evaluation of the sludge storage conditions influence on biogas production through biodegradation tests. The sludge, stored for approximately six months, was collected from a wastewater treatment plant of tanneries that use chromium salts as tanning agent. Two conditions were analyzed: ambient conditions, where the sludge was kept at room temperature and there was no oxygen entrance sealing, and better preservation conditions, where the sludge was kept under refrigeration and the oxygen entrance was sealed. Analyses were conducted through the assembly of biodegradation tests of wet-blue leathers with sludge in bench bioreactors. The response factor was the biogas and the methane production, measured by volume and gas chromatography, respectively. The results showed that the way sludge is stored influences the biogas production in volume. The tests with sludge kept at ambient conditions showed higher biogas production. However, it does not influence the quality of biogas – methane percentage. Both cases analyzed showed a similar percentage of methane throughout the process.

INTRODUCTION

The main solid wastes generated by tanneries are sawdust, wet-blue shavings, hide and leather trimmings and sludge from wastewater treatment plants. These residues are generated after tanning and are usually disposed in hazardous industrial landfills, which are characterized as places of waste confinement and undergo an uncontrolled biological waste treatment. The main residue of any wastewater biological treatment is sludge. Its amount has increased as a consequence of the increasing treated industrial wastewater (Athanasoulia *et al.*, 2012). In recent years, the organic fraction of solid waste has been recognized as a valuable resource that can be converted into useful products through microbial transformation (Khalid *et al.*, 2011).

Anaerobic digestion consists in the growth of microorganisms through organic and inorganic compounds degradation in molecular oxygen absence (Lastella *et al.*, 2002). Methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) – biogas – are the main products of this process. Also, a remaining residue, rich in nitrogen, is produced (Wiszniewski, *et al.*, 2006). The biological treatment is appropriate for waste organic pollutants removal (Narihiro and Sekiguchi, 2007), because it convert almost all types of biomass, including toxic organic waste, into highly energetic biogas, in such way that acts simultaneously in waste treatment and energy production (Meester *et al.*, 2012). Moreover, it is considered a renewable energy source since it reduces the environmental impacts, including CO₂ emissions (Hjorth *et al.*, 2011). The type, availability and complexity of the substrate, the temperature, the humidity

and the presence of inhibitory substances, such as ammonia, sulfides and heavy metals are among the factors that influence anaerobic digestion (Khalid *et al.*, 2011). Anaerobic digestion process occurs in four interrelated stages: hydrolysis, fermentation (or acidogenesis), acetogenesis and methanogenesis. Generally, most of soluble organic materials in the medium are converted into volatile fatty acids by fermentation and into biogas by methanogenesis. Biogas produced by anaerobic digestion is mainly composed of 48–65% of methane (CH₄) and 36–41% of carbon dioxide (CO₂) and of less significant quantities of hydrogen sulfide (H₂S), other sulfur compounds and ammonia (NH₃). Occasionally, small amounts of hydrogen (H₂), nitrogen (N₂), halogenated or saturated hydrocarbons and oxygen (O₂) are also found. Generally, the gas is saturated with water vapor and may contain dust particles and organic silicon compounds. In some production sites, it may also contain siloxanes and aromatic and halogenated volatile organic compounds (Khalid *et al.*, 2011). However, the real composition of biogas varies among different locations and also at one location, due to changes in process and raw material conditions (Rasi *et al.*, 2011).

The calorific value of biogas is mainly determined by its methane content (Bacocchi *et al.*, 2012), which has a typical calorific value of 21–24 MJ/m³ or 6 KWh/m³ (Bond and Templeton, 2011). The methane yield in biogas (methane percentage) is affected by many factors, including substrate type and composition, microbial composition, temperature, humidity and bioreactor design (Khalid *et al.*, 2011). The volumetric methane production is affected by the same factors that affect the percentage of methane in biogas, but it is also influenced by the amount of water added to the digestion system (Mooler *et al.*, 2004).

Dhayalan *et al.* (2007) studied the biodegradability of untanned, chrome tanned and vegetable tanned leather under anaerobic conditions. It has been found that vegetable tanned leather leads to more gas production than chrome tanned leather. With chrome tanned materials, there was not much change in the volume of the gas produced from the two different sources. It has been found that detanning tends to improve the biodegradability of both types of leathers. Zupancic and Jemec (2009) studied the anaerobic treatment of different types of tannery waste (fleshings, skin trimmings and wastewater sludge). The start-up procedure of a tannery waste thermophilic anaerobic digestion in 100 days using seed from mesophilic digester processing municipal sludge is presented. Chromium content and salinity showed no adverse effects; however a reactor temperature reduction of 4.4°C led to a drop in biogas production of 25%, indicating a requirement to keep the temperature constant at 55°C.

In this context, this paper aims to evaluate the influence of sludge storage conditions in biogas production, measured by volume and quality (methane percentage) of the generated gas, in bench bioreactors. The sludge was collected from a wastewater treatment plant of tanneries that use chromium salts as tanning agent. The wet-blue leather shaving (solid waste generated in the process of chrome tanned leather) was also added. The sludge storage conditions are an important factor when the process is designed and scaled up to industrial scale. The main aspects studied were the storage temperature and the oxygen passage during storage.

MATERIAL AND METHODS

The tannery waste biodigestion through the activity of methane producer microorganisms was carried out in bench bioreactors. These bioreactors were made of glass, with a volume of 350 mL and were kept in a thermostatic bath at 35°C. They had two valves:

a superior, used to measure the gas produced volume, and a lateral, used to collect samples for gas chromatography analysis, as shown in Figure 1.

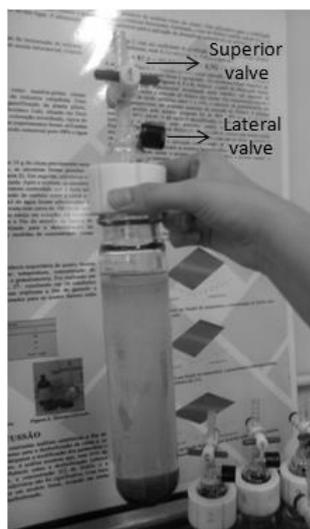


Figure 1. Bench scale bioreactor.

The experiments assembly, based on the results obtained from Priebe *et al.* (2013), was performed by adding, in each bioreactor: 1 g of wet-blue leathershaving, 25 mL of activated sludge, collected from a wastewater aerobic treatment plant of a tannery that use chromium salts as tanning agent, and 250 mL of a nutrient solution, to ensure favorable conditions for the microorganisms initial growth. The nutrient solution has been purposed for Dettmer *et al.* (2012), with the composition of: 2 g/L of yeast extract, 1 g/L of peptone, 7 g/L of K_2HPO_4 and 3 g/L of KH_2PO_4 .

Two experimental conditions were tested in duplicate in a way that the only difference between the pairs of bioreactors was the sludge storage condition, for about six months before the experiment starting. At duplicate 1, bioreactors 1 and 2, the sludge was stored at room temperature without oxygen inlet sealing, simulating ambient storage conditions. At duplicate 2, bioreactors 3 and 4, the sludge was stored under refrigeration and the oxygen inlet was sealed, simulating better conservation conditions.

The total gas volume generated in the bioreactors was measured daily with a device, shown in Figure 2, based on the water volume shift through pressure equalization.

To perform the measurements, a hose was connected between the device and the bioreactor superior valve. First, the device valve was opened to relieve the remaining pressure and the amount of water that left was discarded. Thereafter, the bioreactor valve was opened releasing through the device a volume of water equivalent to the biogas volume generated in the bioreactor. This amount of water was weighed and converted to volume by the density of water at room temperature at the time of measurement.

To determine the composition of the gases generated in the bioreactors, a gas chromatograph (GC) equipped with a thermal conductivity detector (TCD) and two packed columns, Porapak Q (80–100 mesh) and Molecular Sieve 13X (80–100 mesh) was used. The first column, Porapak Q, determined the fraction of air ($N_2 + O_2$), methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2). The other, Molecular Sieve 13X, determined the ratio between N_2 and O_2 in the air. Helium was used as carrier gas in both columns. The equipment used was a gas chromatograph Auto System XL/GC, Perkin-Elmer, with interface command via Turbochrom 6.0 software. The analysis conditions were based on Priebe *et al.* (2013).



Figure 2. Device used for measuring the total gas volume generated in the bioreactors.

RESULTS AND DISCUSSION

The four bioreactors were kept in operation for 118 days. The average of the total gas volume generated between each duplicate is shown in Figure 3. The curves performance is characteristic of growth in closed culture media and the values obtained were within the expected compared with the values obtained by Priebe *et al.* (2013), that studied the potential of biogas production by various substrates containing collagen, including tannery wastes, in bench scale under controlled conditions and obtained volumes of 300 mL of biogas produced.

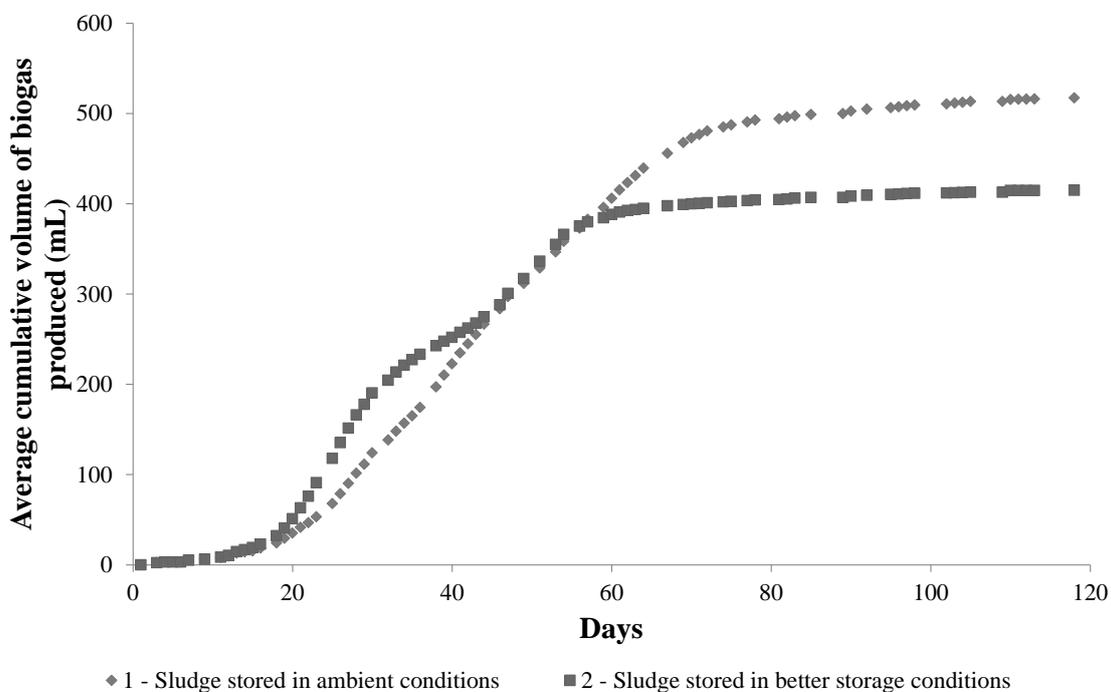


Figure 1. Average cumulative volume of biogas produced.

It is observed that duplicate 1, bioreactors with ambient storage conditions sludge, produced more biogas. These bioreactors biogas production stabilized around 70th day of experiment, while in duplicate 2, the stabilization already occurred around 55th day. The initial growth of duplicate 1 is less pronounced than duplicate 2.

Examples of chromatograms obtained during the experiment are shown in Figure 4.

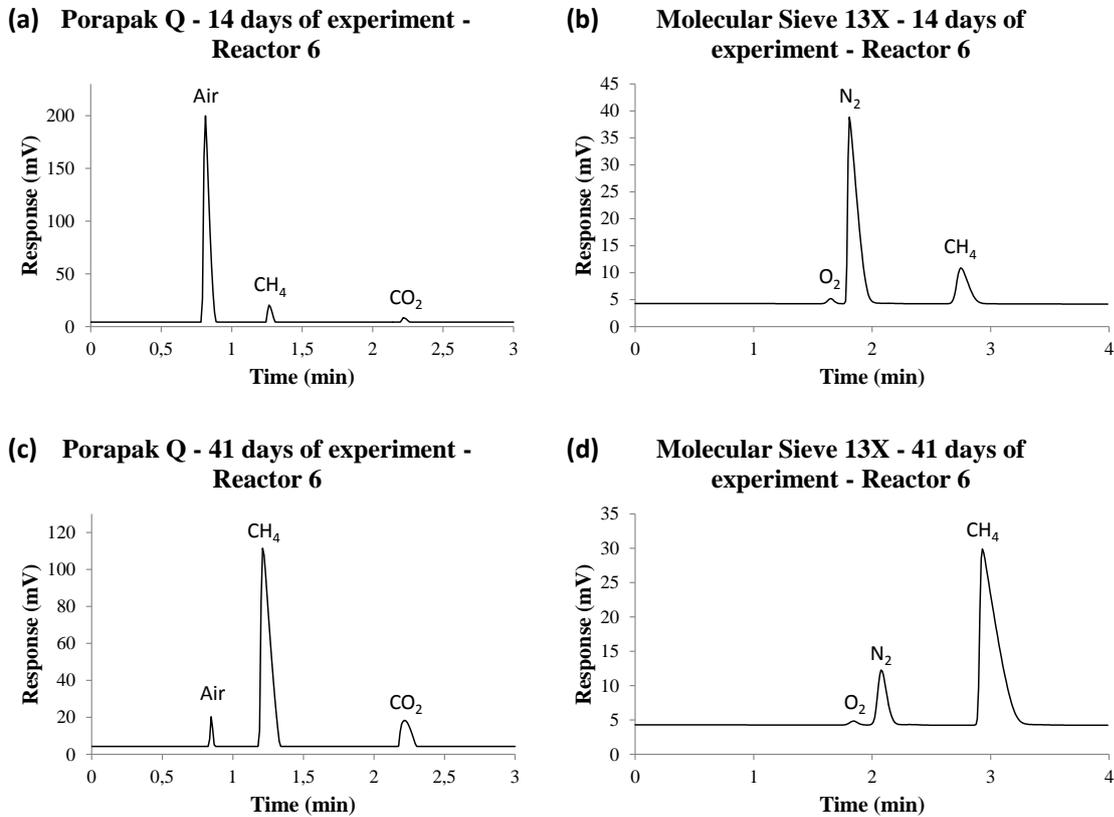


Figure 2. Examples of chromatograms generated in mV x s with samples collected in the 2nd week of experiment – (a) and (b) – and with samples collected at the 6th week of experiment – (c) and (d).

Figure 4(a) and 4(b) show a large amount of air and small amounts of methane and carbon dioxide. Likewise, Figure 4(c) and 4(d) show a large amount of methane and a significant reduction of air inside the bioreactor.

From the peak area values obtained in the chromatography, it was estimated the amount of methane generated during the process. First, all areas obtained were divided by response factors obtained from Dietz (1967), required to get the real response of the amounts present in the bioreactor (Priebe *et al.*, 2013). With the new calculated areas, only the percentage among them was taken into consideration. The peak time was not strictly considered due to its great sensibility to sample introduction in the equipment.

To calculate the percentage of methane in biogas, only the areas proportions obtained with Porapak Q column analyzes were considered, because the peak related to methane in Molecular Sieve 13X column can not efficiently separate carbon dioxide from methane, which would amplify the amount of methane. The results obtained from Molecular Sieve 13X analyzes were used to monitor the amount of oxygen in the bioreactors.

Once the methane percentage was obtained in the days of chromatography analyzes – weekly frequency – a linear behavior was estimated between each of these days, so the percentage of methane in the days when chromatography was not held was calculated. With

the percentage of methane obtained in all days, these values were multiplied by the volume of biogas measured in each day, resulting in the volume of methane produced daily. The average of the methane volume generated between each duplicate is shown in Figure 5.

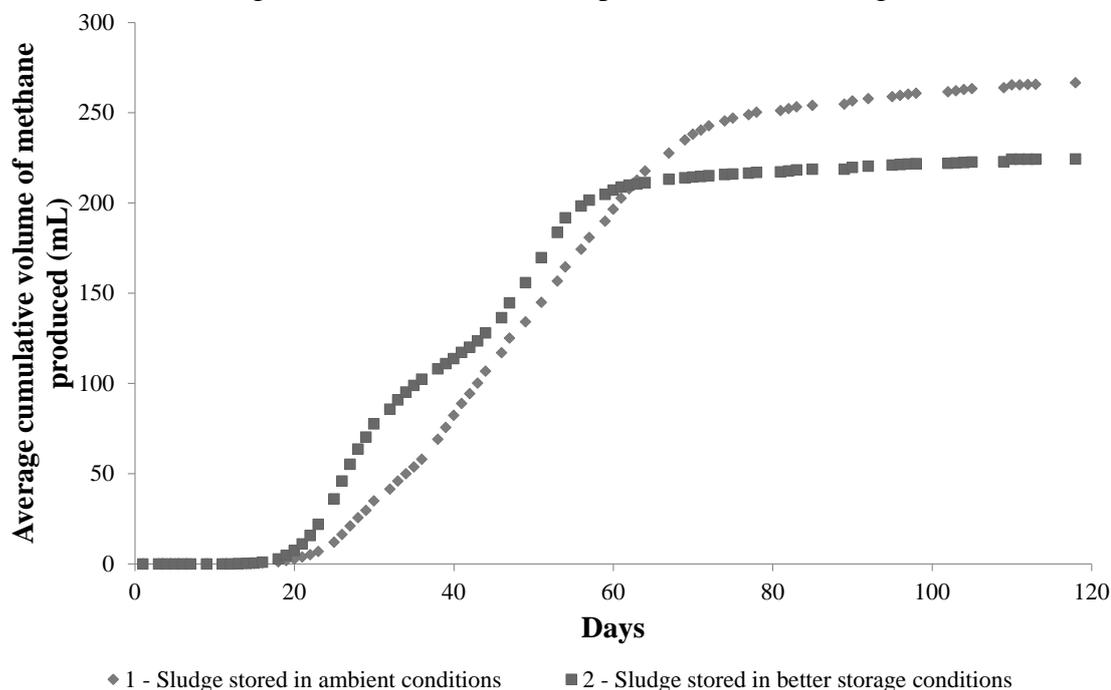


Figure 3. Average cumulative volume of methane produced.

It is observed that the cumulative volume of methane followed the same tendency of the cumulative volume of biogas produced in both duplicates.

CONCLUSION

The sludge storage condition way that showed higher biogas and methane production was the ambient conditions, at room temperature without oxygen passage sealing. It is believed that the oxygen diffusion in the sludge is inefficient independently of the sludge exposure to oxygen and the anaerobic zones are maintained regardless the temperature. As for storage temperature, it is believed that maintaining the microorganisms at low temperatures slows their adaptation to the bioreactors.

It is concluded that the sludge storage condition influences the biogas total volume production. However, the percentage of methane in the process was similar in both cases analyzed implying that the sludge storage condition does not influence the quality of biogas.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the CNPq (Edital UNIVERSAL – MCTI/CNPq N° 14/2010 and N° 14/2013) and the FAPERGS (Edital 04/2012 PqG and Edital FAPERGS/CAPES 17/2012).

REFERENCES

- Athanasoulia, E., Melidis, P., Aivasidis, A. Optimization of Biogas Production from Waste Activated Sludge through Serial Digestion. *Renewable Energy*, v. 47, p. 147-151 (2012).
- Baclocchi, R., Carnevale, E., Corti, A., Costa, G., Lombardi, L., Olivieri, T., Zanchi, L., Zingaretti, D. Innovative Process for Biogas Upgrading with CO₂ Storage: Results from Pilot Plant Operation. *Biomass and Bioenergy*, v. 30, p. 1-10 (2012).
- Bond, T., Templeton, M. R. History and Future of Domestic Biogas Plants in the Developing World. *Energy for Sustainable Development*, v. 15, p. 347-354 (2011).
- Dettmer, A., Cavaleiro, J. C., Cavalli, É., Rossi, D. M., Gusatti, S. C., Ayub, Z. M. A., Gutterres, M. Optimization of the Biotechnological Process for Hide Unhairing in Substitution of Toxic Sulfides. *Chemical Engineering & Technology*, v. 35, p. 803-810 (2012).
- Dietz, A.W. Response Factors for Gas Chromatographic Analyses. *Journal of Gas Chromatography*, v. 5(2), p. 68-71 (1967).
- Hjorth, M., Gränitz, K., Adamsen, A. P. S., Moller, H. B. Extrusion as a pretreatment to increase biogas production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4989-4994 (2011).
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, v. 31, p. 1737-1744 (2011).
- Lastella, G., Testa, C., Cornacchia, G., Notornicola, M., Voltasio, F., Sharma, V. K. Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. *Energy Conversion and Management*, v. 43, p. 63-75 (2002).
- Meester, S., Demeyer, J., Velghe, F., Peene, A., Langenhove, H., Dewulf, J. The environmental sustainability of anaerobic digestion as a biomass valorization technology. *Bioresource Technology*, v. 121, p. 396-403 (2012).
- Moller, H. B., Sommer, S. G., Ahring, B. K. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy*, v. 26, p. 485-495 (2004).
- Narihiro, T., Sekiguchi, Y. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 273-278 (2007).
- Priebe, G. P. S., Marcílio, N. R., Gusmão, A. L., Kipper, E., Gutterres, M. Biogas production from leather industry wastes. In: INTERNATIONAL UNION OF LEATHER TECHNOLOGISTS AND CHEMISTS SOCIETIES, 32, 2013, Istanbul, Anais.
- Rasi, S., Läntelä, J., Rintala, J. Trace Compounds Affecting Biogas Energy Utilisation – A Review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 3369-3375 (2011).
- Wiszniewski, J., Robert, D., Surmaez-Gorska, J., Miksch, K., Weber, J. V. Landfill Leachate Treatment Methods: A Review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 4, p. 51-61 (2006).

Anexo III

Contagem de Microrganismos

Tabela AIII. Número de UFC nos frascos do experimento 1 e 2 de coleta de alíquotas de biomassa dos biorreatores após três semanas de incubação, com indicação dos frascos utilizados para estimativa de biomassa em cada fase do biorreator.

Frascos Experimento 1	UFC	Frascos Experimento 2	UFC
1S11a	Incontáveis	2S1a	Incontáveis
1S11b	Incontáveis	2S1b	Incontáveis
1S12a	Incontáveis	2S1a*	Incontáveis
1S12b	Incontáveis	2S1b*	Incontáveis
1S13a	110	2S2a	153
1S13b	93	2S2b	191
1S14a	13	2S2a*	Incontáveis
1S14b	10	2S2b*	Incontáveis
1S15a	16	2S3a	55
1S15b	15	2S3b	80
1S21a	Incontáveis	2S3a*	52
1S21b	Incontáveis	2S2b*	57
1S22a	Incontáveis	2S4a	9
1S22b	Incontáveis	2S4b	3
1S23a	87	2S4a*	17
1S23b	90	2S4b*	9
1S24a	15	2S5a	1
1S24b	9	2S5b	1
1S25a	14	2S5a*	0
1S25b	15	2S5b*	1
1L11a	Incontáveis	2L1a	Incontáveis
1L11b	Incontáveis	2L1b	Incontáveis
1L12a	19	2L1a*	Incontáveis
1L12b	23	2L1b*	Incontáveis
1L13a	0	2L2a	52
1L13b	0	2L2b	39
1L14a	0	2L2a*	48
1L14b	0	2L2b*	35
1L15a	0	2L3a	0
1L15b	0	2L3b	0

Tabela AIII. (continuação) Número de UFC nos frascos do experimento 1 e 2 de coleta de alíquotas de biomassa dos biorreatores após três semanas de incubação, com indicação dos frascos utilizados para estimativa de biomassa em cada fase do biorreator.

1L21a	Incontáveis	2L3a*	1
1L21b	Incontáveis	2L2b*	1
1L22a	22	2L4a	0
1L22b	25	2L4b	0
1L23a	1	2L4a*	0
1L23b	2	2L4b*	0
1L24a	0	2L5a	0
1L24b	0	2L5b	0
1L25a	0	2L5a*	0
1L25b	0	2L5b*	0