

### **III-391 - CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE DE PROCARIOTOS ATUANTE NO PROCESSO DE BIOMETANIZAÇÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS**

**Carolina Ibelli Bianco<sup>(1)</sup>**

Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Araras/SP. Mestranda em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP).

**Fernanda Resende Vilela**

Engenheira Ambiental pela Fundação de Ensino Superior de Passos (FESP), Passos/MG. Mestranda em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP).

**Júlia Inforzato Guermandi**

Engenheira Ambiental pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), campus Rio Claro/SP. Mestranda em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP).

**Valdir Schalch**

Engenheiro Químico pela Escola Superior de Química Oswaldo Cruz/SP. Mestre e Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP). Professor visitante da Universidade de Nebraska, Lincoln/EUA. Atualmente é livre-docente da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo e coordenador do NEPER - Núcleo de Estudo e Pesquisa em Resíduos Sólidos.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Avenida Trabalhador São-carlense, 400, Centro – São Carlos - SP - CEP: 13566-590 - Brasil - Tel: (16) 33739333 - e-mail: [carol.bianco@hotmail.com](mailto:carol.bianco@hotmail.com)

#### **RESUMO**

A exploração da tecnologia de biometanização facilitaria a adequação dos municípios brasileiros à Política Nacional de Resíduos Sólidos, instituída em 2010, a qual prioriza o não aterramento da fração orgânica e a recuperação energética dos resíduos. No Brasil, a biometanização ainda não é difundida para o tratamento de resíduos sólidos orgânicos, principalmente devido aos seguintes fatores: ausência do hábito de separação dos resíduos na fonte, bem como da implantação de coleta seletiva na maioria dos municípios; inexistência de uma configuração de tratamento anaeróbio adaptada às condições brasileiras; longo tempo de estabilização dos resíduos pelo processo anaeróbio quando comparado com o aeróbio e restrito conhecimento quanto à partida, operação e controle do sistema. O presente trabalho propôs a análise da comunidade microbiana que se desenvolve durante a digestão anaeróbia, a fim de demonstrar que os dados de parâmetros físico-químicos normalmente analisados podem ser melhor compreendidos se conjugados com dados biológicos, os quais são mais sensíveis à alterações. Foi utilizada a técnica molecular de PCR/DGGE (*Polymerase Chain Reaction/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Verificou-se que, embora as arqueas possam estar presentes em um sistema anaeróbio, apresentando diversidade dentro da comunidade, não há garantia da produção de metano, devido às condições desfavoráveis do meio.

**PALAVRAS-CHAVE:** diversidade microbiana, digestão anaeróbia, metano, lodo de esgoto, inóculo.

#### **INTRODUÇÃO**

Desde o ano de 2010, o Brasil possui uma lei exclusivamente destinada ao tema “resíduos sólidos”: trata-se da Lei Federal 12.305, que em 02 de agosto de 2010 implantou no país a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), a qual foi regulamentada pelo Decreto 7.404, em 23 de dezembro do mesmo ano.

Este marco, apesar de tramitar durante 21 anos no Congresso Nacional antes de ser sancionado, demonstra uma preocupação em relação à gestão e ao gerenciamento daquilo que é descartado, buscando-se direcionar e

regularizar em território nacional as ações referentes aos resíduos sólidos, a fim de proteger o ambiente e preservar os recursos naturais (PEREIRA NETO, 2011; FIESP, 2012).

Dentre a diversidade de resíduos sólidos gerados, destacam-se os resíduos sólidos urbanos (RSU), os quais ainda são destinados inadequadamente em todas as regiões e estados do Brasil, mesmo com esta legislação mais restritiva. Segundo a ABRELPE (2013), 60% dos municípios brasileiros fazem uso de locais impróprios para a destinação final dos RSU coletados.

Pode-se considerar que a ideia de “locais impróprios” envolve tanto o fato de dispor aquilo que é coletado em qualquer lugar que não seja um aterro sanitário, bem como dispor em aterro sanitário os resíduos, que diferentemente dos rejeitos, ainda possuem potencial de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis (BRASIL, 2010).

Um dos fatores que impede a reversão do quadro apresentado é a ausência de um sistema eficiente de coleta seletiva, a qual deve ir além da disponibilização de pontos de entrega voluntária e/ou convênios com cooperativas de catadores. Os responsáveis pelos municípios devem implementar a coleta seletiva de forma a abranger toda a população, pautando-se no princípio da hierarquia para a gestão dos resíduos, os quais devem ser previamente separados na fonte de acordo com a sua composição (BRASIL, 2010; ABRELPE, 2013).

A coleta seletiva ainda não é praticada assiduamente no país, acarretando o desperdício de recursos materiais e energéticos presentes nos resíduos descartados. É o caso da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU), gerada diariamente e em quantidade representativa (constitui mais da metade dos RSU coletados: 51%) (ABRELPE, 2012).

Quando segregada dos demais resíduos, a FORSU torna-se passível de tratamento biológico por meio da digestão aeróbia (compostagem) ou da digestão anaeróbia (biometanização) (BORGLIN; HAZEN; OLDENBURG, 2004) resultando, dentre outros benefícios, no prolongamento da vida útil do aterro sanitário, além da geração de um composto com valor comercial e, no caso da biometanização, também se tem a obtenção de energia (biogás) (REICHERT, 2005).

No Brasil foram empreendidas iniciativas para o tratamento da FORSU, principalmente por meio da compostagem. Quanto ao tratamento por biometanização, o Brasil não dispõe de planta industrial para resíduos sólidos orgânicos, somente para efluentes líquidos sanitários, industriais (têxtil, laticínio, entre outros) e da agroindústria (suinocultura), bem como unidades de recuperação e utilização do biogás produzido em aterros sanitários e estações de tratamento de esgoto (GOMES, 2010).

Pelo fato dos sistemas de digestão anaeróbia terem sido desenvolvidos inicialmente para o tratamento de efluentes líquidos, a sua utilização no tratamento da FORSU constituiu-se em uma adaptação dessa tecnologia e, dada as particularidades dos resíduos sólidos, os sistemas enfrentam diversas dificuldades para operarem de forma adequada, além de requererem um longo tempo para a bioestabilização (FRICKE et al., 2007).

Contudo, apesar da compostagem ser uma prática amplamente testada, de baixo custo e com produção de um composto com valor comercial, a biometanização, mesmo sendo uma tecnologia mais complexa e que requer maior investimento, tem sua aplicação sendo expandida por toda a Europa, com resultados positivos (CASTANHEIRA; FERREIRA; LOPES [200?]).

O principal interesse pela utilização da digestão anaeróbia recai na possibilidade de tratar os resíduos sólidos orgânicos gerados diariamente e, simultaneamente, obter uma fonte de energia renovável em um período da história humana no qual a demanda energética é crescente e dependente de combustíveis fósseis (SINGHAL; BANSAL; SINGH, 2012).

Para lidar com os distúrbios que normalmente afetam os sistemas anaeróbios é necessário identificar as causas dos problemas e os fatores que limitam os processos metabólicos. A partir disso, o entendimento dos fenômenos físicos, químicos e biológicos que governam o tratamento anaeróbio poderá fornecer meios para a prevenção e controle dos desequilíbrios que surgirem (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

A eficiência do processo de biometanização não é somente produto da engenharia do reator e da regulação de fatores ambientais como temperatura, pH, carga orgânica aplicada, entre outros. Juntamente a isso, a eficiência da biometanização depende da dinâmica microbiana, pois são os micro-organismos os responsáveis diretos pelo funcionamento do sistema anaeróbio.

Além das técnicas tradicionais para o estudo dos micro-organismos, o uso de técnicas moleculares pode auxiliar na otimização do sistema anaeróbio, ao permitir a identificação da estrutura e da função da comunidade microbiana, bem como as relações ecológicas estabelecidas no biometanizador (KHALID et al., 2011).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a comunidade microbiana (domínios *Bacteria* e *Archaea*) desenvolvida durante o processo de biometanização da FORSU em biometanizadores de 50 L e 5 L, operados em sistema batelada, durante 135 e 78 dias, respectivamente, sendo mantidos sob temperatura na faixa mesofílica e inoculados com lodo de esgoto. Foi aplicada a técnica molecular de PCR/DGGE.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi conduzida nas dependências da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

### **BIOMETANIZADORES EXPERIMENTAIS**

Foram adaptados quatro tambores de leite de 50 L (marca Milkan) de forma que favorecessem o estabelecimento de um meio anaeróbio, permitissem a medição da temperatura no interior do biometanizador, a coleta de biogás e chorume, bem como a adição de substâncias (água, solução alcalinizante e chorume).

Na tampa, a saída para biogás foi acoplada a uma mangueira de poliuretano conectada a um frasco de Mariotte de 1 L, responsável pela medição do volume de biogás produzido nos biometanizadores.

Na lateral do biometanizador foi inserido um tarugo de nylon perfurado no diâmetro do termopar tipo K (sensor de temperatura simples), permitindo sua passagem para o lado externo com reduzida possibilidade de entrada de oxigênio no meio interno. O termopar foi encapado com espagete termocontrátil para evitar sua oxidação. Para a leitura da temperatura, o sensor foi conectado a um termômetro digital (Minipa MT-405).

### **COLETA DOS RESÍDUOS**

Cada biometanizador constituiu um tratamento diferente. Com o objetivo de equilibrar o sistema e favorecer a atividade microbiológica, testou-se a digestão anaeróbia da FORSU em conjunto com serragem (resíduo com elevada relação carbono/nitrogênio (C/N)) e lodo de esgoto (inóculo) proveniente de reator UASB da Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, São Carlos/SP.

A fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU) foi coletada em estabelecimentos localizados ao redor da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Os responsáveis pelos estabelecimentos foram previamente informados sobre o projeto através de um *folder* explicativo. Optou-se por utilizar a FORSU separada na fonte para evitar resíduos não biodegradáveis e indesejados que pudessem prejudicar o processo, além de incentivar a prática da responsabilidade compartilhada, conforme estabelecido na atual Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010) (BRASIL, 2010).

### **PREPARO DOS RESÍDUOS E PREENCHIMENTO DOS REATORES**

No dia seguinte à coleta, a FORSU foi triturada em triturador elétrico modelo TRAPP 500E, o qual fornece um tamanho máximo de corte de 10 cm. Os resíduos coletados caracterizaram-se por serem majoritariamente restos de frutas, verduras e hortaliças.

A partir dos três resíduos afluentes (Figura 1), os biometanizadores foram preenchidos da seguinte forma:

- biometanizador 1 – somente FORSU (controle);
- biometanizador 2 – FORSU, serragem e lodo;
- biometanizador 3 – FORSU, serragem e o dobro da quantidade de lodo do biometanizador 2;
- biometanizador 4 – FORSU e serragem.



**Figura 1: Resíduos que compuseram o conteúdo afluente dos biometanizadores. a) FORSU triturada. b) serragem. c) lodo de esgoto de reator UASB.**

O regime de alimentação dos biometanizadores foi em batelada, com operação em fase única (as reações físico-químicas e microbiológicas do processo anaeróbio ocorreram em um único reator), via seca (alto teor de sólidos do afluente: entre 20 e 35%) e temperatura mesofílica (temperatura variando em torno da temperatura ambiente – 25°C).

A composição em massa do afluente de cada biometanizador foi calculada considerando-se a densidade e a relação C/N dos componentes, de forma a atingir 70% da capacidade útil dos biometanizadores e uma relação C/N do resíduo de entrada entre 20 a 30/1 (Tabelas 1 e 2). Entretanto, este cálculo teórico não foi adequado, pois após o preenchimento dos biometanizadores, verificou-se que a relação C/N do material de entrada encontrava-se acima do valor pretendido. No caso, o cálculo deveria ter sido feito na base seca. A Tabela 3 apresenta as características físico-químicas dos materiais de entrada dos biometanizadores.

**Tabela 1: Dados utilizados no cálculo da composição mássica do conteúdo afluente de cada biometanizador.**

Volume do reator (Vr)	Volume ocupado pelo meio drenante (Vd)	Volume útil ((Vr – Vd)*0,7)
50 L	10,9 L	27,4 L
Componentes do afluente	Densidade (kg.m <sup>-3</sup> )	Relação C/N
FORSU triturada	868,25	16,3
Serragem	142,5	132,6
Lodo	981,5	4,64

**Tabela 2: Composição em massa dos resíduos de entrada dos biometanizadores.**

Biometanizadores	FORSU triturada (kg)	Serragem (kg)	Lodo de esgoto (kg)
1	24	-	-
2	12	1,76	1,34
3	11	1,76	2,69
4	13	1,76	-

**Tabela 3: Características dos resíduos de entrada dos biometanizadores de 50 L.**

Biometanizadores	pH	DQO (gO <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> )	ST (%)	STV (%)	U (%)	Relação C/N
1	4,34	619,5	11,04	94,92	88,96	63
2	4,14	549,5	31,58	99,84	68,42	77
3	4,20	552	21,43	95,1	78,57	62
4	4,21	517	27,74	96,06	72,25	173

Pelo fato dos resíduos de entrada de todos os biometanizadores apresentarem baixo pH (em torno de 4), foi necessário acrescentar uma base forte (NaOH) para que o pH de partida fosse elevado à aproximadamente 8. Em cada biometanizador foram colocados 30,7 g de NaOH diluídos em 500 mL de água destilada, homogeneizando-o à massa de resíduos.

Após serem vedados, os biometanizadores foram operados por 135 dias e, durante este período, foram monitorados quinzenalmente por meio das análises físico-químicas apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4: Análises realizadas quinzenalmente para o monitoramento e controle da digestão anaeróbia.**

AMOSTRA	PARÂMETRO ANALISADO
Chorume	pH
	Alcalinidade (Total e à Bicarbonato)
	Ácidos Graxos Voláteis
	Sólidos (Totais, Voláteis e Fixos)
	Carbono Orgânico Total
	Nitrogênio (Total e Amoniacal)
	Demanda Química de Oxigênio
	Fósforo (Total e Inorgânico)
	Cloretos
	Sulfetos
Biogás	Composição por cromatografia gasosa (H <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> )

A medição de temperatura (interna de cada biometanizador, do laboratório e da área externa ao laboratório) foi realizada diariamente, desde o dia da vedação até a abertura dos biometanizadores.

A partir do 15º dia de operação, fez-se a recirculação do chorume uma vez por semana, a fim de manter a umidade na massa de resíduos em digestão e fazer o retorno de nutrientes. Todo o chorume dos biometanizadores era drenado, fazia-se a medição do pH e caso estivesse abaixo de 6,5, um alcalinizante era adicionado (foram utilizados: hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio). O cálculo da quantidade de alcalinizante adicionada foi baseado nos níveis ditos inibitórios em referências da literatura: 3500 – 5500 mg.L<sup>-1</sup> para sódio (VAN BUREN, 1979) e 2500 mg.L<sup>-1</sup> para potássio (PARKIN e OWEN, 1986). As recirculações foram realizadas até o 2º mês de operação, pois o pH do chorume passou a apresentar valores abaixo de 6,5 e não poderiam mais ser corrigidos com alcalinizantes devido ao risco de inibição.

Como não houve produção de metano em nenhum dos reatores após 97 dias de operação, decidiu-se montar biometanizadores em menor escala. A composição dos afluentes dos novos biometanizadores baseou-se na composição do biometanizador de 50 L que apresentava o melhor desempenho até então (principalmente aquele cujo chorume indicasse os menores valores de DQO e STV em relação aos valores iniciais, pH mais elevado e estável, presença de alcalinidade e maior produção de biogás).

No caso, o biometanizador 3 apresentava-se o mais promissor, pois, mesmo não produzindo metano, era o sistema que gerava mais biogás e os resultados das análises físico-químicas do chorume indicavam maior degradação da matéria orgânica do meio.

Os três novos biometanizadores também eram tambores de leite (marca *Milkan*), mas agora com capacidade total de 5 L. Foram adaptados para a saída e coleta de biogás, bem como para a entrada de substâncias. Não foi feita nenhuma saída para o chorume e, portanto, não colocou-se meio drenante no fundo dos biometanizadores.

Além disso, não foi inserido termopar para a medição da temperatura, pois, durante a operação dos biometanizadores de 50 L, verificou-se que a temperatura interna do sistema assemelhava-se à temperatura ambiente. Assim, para manter uma temperatura mais estável no interior dos biometanizadores de 5 L, colocou-os dentro de uma estufa, cuja temperatura mantinha-se em torno de 30°C pelo uso de duas lâmpadas de 60 W.

Os biometanizadores de 5 L, além de conterem FORSU e serralagem, foram todos inoculados, sendo as fontes de inóculo as seguintes:



- biometanizadores ETE 1 e ETE 2 – inoculados com lodo de esgoto de reator UASB proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, São Carlos/SP, o mesmo utilizado nos biometanizadores de 50 L 2 e 3;
- Biometanizador DACAR – inoculado com lodo granulado de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de avicultura, obtido na Avícola Dacar, Tietê/SP. Este lodo foi levemente batido em liquidificador para facilitar sua homogeneização ao misturá-lo com FORSU e serragem.

A capacidade útil dos biometanizadores de 5 L foi de 70% (3,5 L) e as proporções de inóculo, FORSU e serragem foram definidas a partir dos sólidos totais voláteis destes componentes (Tabela 5), o que permitiu calcular a massa úmida de cada mistura afluyente (Tabela 6).

**Tabela 5: Porcentagem de sólidos totais e sólidos voláteis presentes nos componentes das misturas afluentes dos biometanizadores de 5L.**

Componentes das misturas afluentes	ST (%)	STV (%)
<b>FORSU</b>	11,04	94,92
<b>Serragem</b>	93,55	96,62
<b>Lodo ETE</b>	4,82	62,33
<b>Lodo DACAR</b>	2,72	70,97

**Tabela 6: Caracterização dos biometanizadores de 5 L quanto à proporção de cada resíduo que compõe a massa afluyente.**

Biometanizador	Proporção inóculo:FORSU:serragem	Massa de inóculo (kg)	Massa de FORSU (kg)	Massa de serragem (kg)
<b>ETE 1</b>	3:1:1	3,34	0,32	0,04
<b>ETE 2</b>	2:2:1	3,34	0,95	0,06
<b>DACAR</b>	2:2:1	3,14	0,57	0,03

Conforme os valores em massa da Tabela 6, os resíduos foram pesados em balança de precisão de 2000 g (Marca Digimed, modelo DG-2000), sendo que após a mistura dos resíduos, fez-se a medição do pH (pHmetro de bancada Digimed, modelo DM-22) para acertá-lo para 7,5 caso fosse necessário.

Os valores de pH obtidos após a mistura dos componentes são apresentados na Tabela 7. Mesmo que o pH das misturas estivesse próximo de 7,5, optou-se por adicionar dois alcalinizantes (bicarbonato de sódio -  $\text{NaHCO}_3$  e bicarbonato de potássio -  $\text{KHCO}_3$ ) para garantir um efeito tampão na partida dos biometanizadores (pH final em torno de 7,5). Pelo fato das misturas apresentarem consistência mais líquida, os alcalinizantes foram adicionados em pó, sem diluição em água, apenas homogeneizando-os à massa.

**Tabela 7: Valores de pH das misturas afluentes dos biometanizadores e as respectivas quantidades de alcalinizantes adicionadas antes da vedação.**

Biometanizador	pH	$\text{NaHCO}_3$ (g)	$\text{KHCO}_3$ (g)
<b>ETE 1</b>	7,11	22,72	10,46
<b>ETE 2</b>	6,85	28,64	14,28
<b>DACAR</b>	7,25	16,90	10,56

Uma quantidade extra de mistura foi preparada para cada biometanizador como amostra para a caracterização dos afluentes (Tabela 8).

**Tabela 8: Características dos resíduos de entrada dos biometanizadores de 5 L.**

Biometanizador	DQO ( $\text{gO}_2\cdot\text{kg}^{-1}$ )	ST (%)	STV (%)	U (%)	Relação C/N
<b>ETE 1</b>	326,5	7,50	75,73	92,50	20,89
<b>ETE 2</b>	393,9	7,98	79,3	92,02	53,39
<b>DACAR</b>	417,4	8,19	77,1	91,81	47,62

Os biometanizadores foram vedados com silicone na tampa e operados por 78 dias.

## ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

### Coleta das amostras

Para os biometanizadores de 50 L, a primeira coleta foi feita após dois meses do início do experimento, a segunda coleta ocorreu dois meses após a primeira e a terceira coleta deu-se com o intervalo de um mês da segunda. As amostras da primeira e da segunda coleta foram somente chorume, enquanto que as amostras da terceira coleta foram chorume e digestato. Quanto aos biometanizadores de 5 L, não houve coleta periódica de chorume, sendo analisados somente o digestato após a abertura, ao final do experimento. Para a análise de PCR/DGGE, as amostras frescas foram centrifugadas e os *pellets* armazenados à - 20°C até o momento da extração do DNA.

### PCR/DGGE

#### Preparo e armazenamento das amostras

##### Amostra líquida

A cada coleta, aproximadamente 80 mL de chorume de cada biometanizador foram centrifugados nas seguintes condições: 7000 rpm, à 10°C, por 5 minutos (centrífuga 5804 R – *Eppendorf*). O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o *pellet* armazenado à - 20°C até o momento da extração do DNA.

Optou-se por centrifugar 13 mL de amostra por vez até completar aproximadamente 80 mL (ao invés de centrifugar os 80 mL de uma única vez), pois a concentração de sólidos no chorume era muito baixa e dessa forma otimizava-se a obtenção do *pellet*.

Para os inóculos (lodos da ETE e da DACAR), o procedimento de obtenção de *pellet* foi o mesmo aplicado para o chorume.

##### Amostra sólida

Após a abertura dos biometanizadores de 50 L, 1 kg do material de saída (digestato) foi coletado e armazenado em sacos plásticos à -20°C até o momento da extração de DNA. Antes da extração, as amostras foram descongeladas em geladeira; em seguida, pesou-se aproximadamente 70 g de cada amostra e adicionou-se 50 mL de água destilada, misturando-se delicadamente. O objetivo deste procedimento foi obter uma solução contendo os micro-organismos que estavam aderidos ao digestato.

A mistura foi coada com o auxílio de uma peneira, visando-se separar a fração sólida da líquida. Para obter o *pellet* a ser utilizado na extração de DNA, centrifugou-se 13 mL da fração líquida à 7000 rpm, 10°C, por 5 minutos (centrífuga 5804 R – *Eppendorf*). O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o *pellet* armazenado à - 20°C até o momento da extração do DNA. Diferente das amostras de chorume, esta quantidade de fração líquida proveniente do digestato foi suficiente para a obtenção do *pellet*, não sendo necessário repetir a operação.

Quanto ao digestato dos biometanizadores de 5 L, o procedimento realizado para a obtenção do *pellet* restringiu-se somente à centrifugação, pois os resíduos finais destes biometanizadores apresentavam consistência mais líquida devido à inoculação com lodo.

### Extração de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada com o Kit *Power Soil DNA Isolation* (MOBIO Laboratories, Inc.), apropriado para remover interferentes da PCR, como, por exemplo, os ácidos húmicos. Os procedimentos efetuados foram basicamente os seguintes:

- Adicionou-se a amostra em um tubo contendo pequenos grânulos submersos em uma solução tampão;
- Seguiu-se com a adição de reagentes fornecidos no Kit, homogeneizações rápidas e centrifugações, permitindo a lise das células, a qual ocorre por processos químicos e mecânicos;
- O DNA genômico total foi então retido em uma membrana de sílica. Após ser lavado e eluído da membrana, está pronto para ser utilizado.

A metodologia aplicada foi a proposta no próprio Kit, apenas com algumas adaptações, conforme segue:

- 1) Para *pellet* das amostras de chorume: pesou-se no mínimo 0,10 g de *pellet* dentro do tubo *PowerBead* (no protocolo original sugere-se pesar 0,25 g de amostra, contudo, devido à pequena quantidade de amostra disponível, testes de extração com 0,10 g foram realizados, obtendo-se sucesso);  
Para *pellet* das amostras de digestato e de inóculos: devido a maior disponibilidade de amostra, seguiu-se o protocolo original, pesando-se no mínimo 0,25 g de *pellet* dentro do tubo *PowerBead*;
- 2) Misturou-se rapidamente no vórtex;
- 3) Adicionou-se 60 µL da solução C1, misturando rapidamente no vórtex;
- 4) Os tubos foram presos horizontalmente com fita no Vortex Adapter para agitação.  
Para amostras de chorume: agitou-se no Vortex Adapter por 10 minutos (foram testados os tempos 10, 15 e 20 minutos, sendo que o de 10 minutos foi suficiente para a massa mínima de 0,10 g);  
Para amostras de digestato: agitou-se no Vortex Adapter por 15 minutos (foram testados os tempos 10, 15 e 20 minutos, sendo que o de 15 minutos foi suficiente para a massa mínima de 0,25 g);
- 5) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm, por 30 segundos, à temperatura ambiente;
- 6) Evitando-se o *pellet*, transferiu-se 500 µL do sobrenadante para um tubo de 2 mL;
- 7) Adicionou-se 250 µL da solução C2:
  - vórtex rápido (aproximadamente 5 segundos);
  - incubação à 4°C por 5 minutos;
- 8) Centrifugou-se os tubos a 10.000 rpm, por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 9) Evitando-se o *pellet*, transferiu-se 600 µL do sobrenadante para um novo tubo de 2 mL;
- 10) Adicionou-se 200 µL da solução C3:
  - vórtex rápido (aproximadamente 5 segundos);
  - incubação à 4°C por 5 minutos;
- 11) Centrifugou-se os tubos a 10.000 rpm, por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 12) Evitando-se o *pellet*, transferiu-se 750 µL do sobrenadante para outro tubo de 2 mL;
- 13) Adicionou-se 1200 µL da solução C4:
  - vórtex rápido (aproximadamente 5 segundos);
- 14) Transferiu-se 675 µL para o *Spin Filter*;
- 15) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 16) Descartou-se a solução que atravessou o filtro;
  - Obs.: Repetiu-se por 3 vezes os três itens anteriores.
- 17) Adicionou-se 500 µL da solução C5;
- 18) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm, por 30 segundos, à temperatura ambiente;
- 19) Descartou-se a solução que atravessou o filtro;
- 20) Centrifugou-se novamente os tubos à 10.000 rpm por 1 minuto, à temperatura ambiente;
- 21) Transferiu-se cuidadosamente o filtro para um tubo de 1,5 mL;
- 22) Adicionou-se 100 µL da solução C6 no centro da membrana do filtro, deixando por 1 minuto na bancada;
- 23) Centrifugou-se os tubos à 10.000 rpm, por 30 segundos, à temperatura ambiente;
- 24) Descartou-se o *Spin Filter*;
- 25) Armazenou-se o conteúdo restante (DNA extraído) à -20°C.

### Quantificação de DNA total

A quantificação do DNA total extraído foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000), obtendo-se a concentração de DNA em ng/µL e os valores das relações  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$ .

O procedimento adotado foi o seguinte:

- 1) Zerou-se o aparelho com 2 µL de solução tampão *Elution buffer type 6* (GE Healthcare);
- 2) Após limpar o aparelho, colocou-se 2 µL da amostra de DNA extraído, em temperatura ambiente.

### Verificação em gel de agarose

A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X. Utilizou-se 2 µL de *ladder* (*Hight DNA Mass Ladder*) e 5 µL de DNA total extraído de cada amostra, corados com 0,7 µL de corante para DNA (*Blue Green Loading Dye I* – LGC Biotecnologia). A imagem do gel foi capturada e visualizada sob luz UV pelo equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, USA).



## PCR/DGGE

### PCR

A partir do DNA extraído das amostras dos biometanizadores, foram obtidos fragmentos do gene RNAr 16S para o domínio *Bacteria* e *Archaea*, utilizando-se a técnica de PCR com *primers* homólogos às regiões conservadas deste gene.

A PCR foi realizada com a enzima *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) e a reação foi padronizada para um volume final de 50 µL, composto por:

- 25 µL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega);
- 1 µL de cada *primer* (senso e anti-senso);
- 4 µL de DNA molde;
- 19 µL de água *nuclease-free*.

Para o domínio *Bacteria* foi utilizado o *set primer* 968FGC – 1401R (NÜBEL et al., 1996), sendo as reações de amplificação realizadas em termociclador *Mastercycler EP Gradient* (Eppendorf). Para o domínio *Archaea*, utilizou-se o *set primer* 1100FGC – 1400R (KUDO et al., 1997) com amplificação realizada no termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer). As condições de tempo e temperatura das amplificações são apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9: Condições de tempo e temperatura que serão aplicadas em cada etapa da reação em cadeia da polimerase para os domínios *Bacteria* e *Archaea*.**

Etapas da amplificação	Ciclos	Condições para o domínio <i>Bacteria</i>		Condições para o domínio <i>Archaea</i>	
		Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Pré-desnaturação	1	7	95	5	94
Desnaturação	35	0,75	94	1	94
Anelamento		0,75	56	1	55
Extensão		1	72	1	72
Extensão final	1	10	72	7	72
Resfriamento	-	-	4	-	4

A confirmação da dimensão e integridade do produto da PCR foi feita através da separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1X. Utilizou-se 5 µL de *ladder* (*Universal DNA Ladder Kit - KAPA*) e 5 µL de cada amostra amplificada, corados com 0,7 µL de corante para DNA (*Blue Green Loading Dye I – LGC Biotecnologia*). A imagem do gel foi capturada e visualizada sob luz UV pelo equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

### DGGE

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (massa/volume), em TAE 1X, com gradiente linear de desnaturante (ureia e formamida) variando de 45 a 65%. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 75 V e temperatura de 60°C durante 16 h. A imagem do gel foi capturada no equipamento *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) com iluminação UV. O perfil de DGGE foi analisado no *software* Bionumerics 3.5. O coeficiente de similaridade e dendrograma foram determinados pelo coeficiente de Jaccard e algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*), respectivamente. Ainda, foram obtidos os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H) para os domínios *Bacteria* e *Archaea*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego da biometanização como destinação da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos será viável quando resultar concomitantemente:

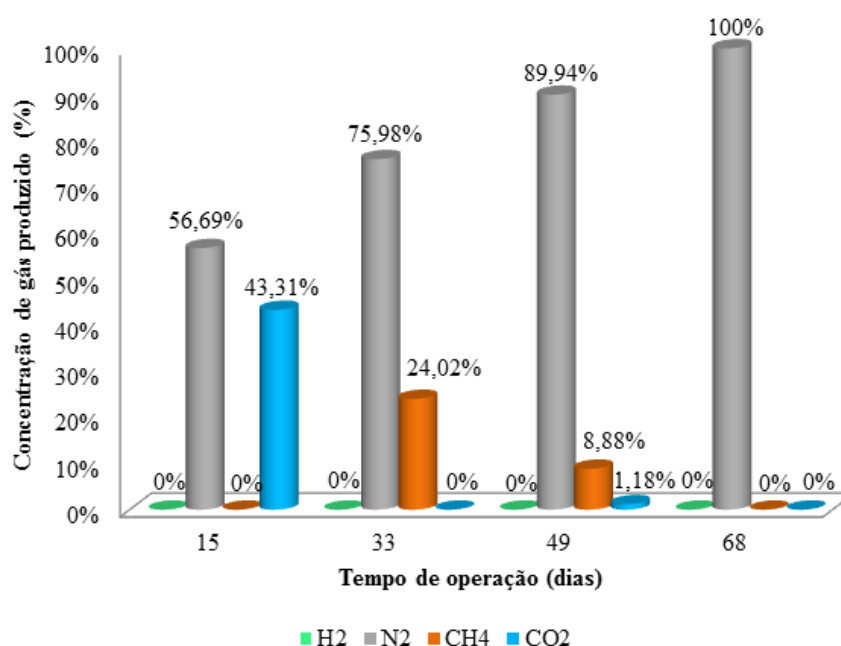
- no tratamento da FORSU, ou seja, na estabilização da matéria orgânica (redução dos sólidos totais voláteis) (CASSINI et al., 2003);

- na produção de biogás com potencial energético, isto é, com concentração de metano acima de 55% (MAGALHÃES, 1986).

Todos os biometanizadores operados no presente trabalho apresentaram redução de sólidos totais voláteis quando comparados os valores de STV do material de entrada (substrato) com o material de saída (digestato) (Tabela 10). Entretanto, nenhum deles apresentou metano na composição do biogás, exceto o biometanizador ETE 2, para o qual registrou-se produção de metano, mesmo que em concentrações abaixo daquelas que possibilitam o aproveitamento energético do biogás (Figura 2).

**Tabela 10: Porcentagem de remoção de sólidos totais voláteis (STV) dos biometanizadores de 50 L e 5 L comparando-se o valor do STV de entrada com o valor do STV de saída.**

Biometanizadores	STV entrada (%)	STV saída (%)	Remoção STV (%)
<b>50 L (operados por 135 dias)</b>			
1	94,92	70,78	25,43
2	99,84	91,82	8,03
3	95,1	90,64	4,69
4	96,06	93,67	2,49
<b>5 L (operados por 78 dias)</b>			
ETE 1	75,73	66,57	12,10
ETE 2	79,3	65,62	17,25
DACAR	77,1	61,49	20,25



**Figura 2: Composição do biogás produzido no biometanizador ETE 2.**

O cenário resultante dos parâmetros físico-químicos apresentados reflete, juntamente com as demais características do meio, a comunidade microbiana atuante em cada tratamento.

Em relação à diversidade de espécies do domínio Bacteria, os biometanizadores de 50 L apresentaram índice de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) em torno de 3,14, enquanto que os biometanizadores de 5 L obtiveram índices em torno de 2,82. Quanto à diversidade de arqueas, os maiores índices foram dos biometanizadores de 5 L, os quais situaram-se próximos a 2,66 contra uma média de 2,24 obtida pelos índices dos biometanizadores de 50 L (Tabela 11).

**Tabela 11: Valores dos índices de diversidade ( $H'$ ) de Shannon-Wiener referentes aos domínios Bacteria e Archaea do material de saída (digestato) dos biometanizadores e dos lodos utilizados como inóculos.**

Biometanizadores	Índice de diversidade ( $H'$ ) Domínio Bacteria	Índice de diversidade ( $H'$ ) Domínio Archaea
<b>50 L (digestato)</b>		
<b>1</b>	3,14	- *
<b>2</b>	3,13	2,21
<b>3</b>	3,23	2,27
<b>4</b>	3,05	- *
<b>5 L (digestato)</b>		
<b>ETE 1</b>	2,89	2,58
<b>ETE 2</b>	2,91	2,48
<b>DACAR</b>	2,65	2,92
<b>Inóculos</b>		
<b>Lodo ETE</b>	3,03	2,32
<b>Lodo DACAR</b>	2,74	2,84

\* **Observação:** os biometanizadores 1 e 4 não possuem valores de  $H$  para o domínio Archaea pelo fato desses tratamentos não apresentarem condições para o desenvolvimento de micro-organismos de tal domínio, além de não terem sido inoculados inicialmente com lodo.

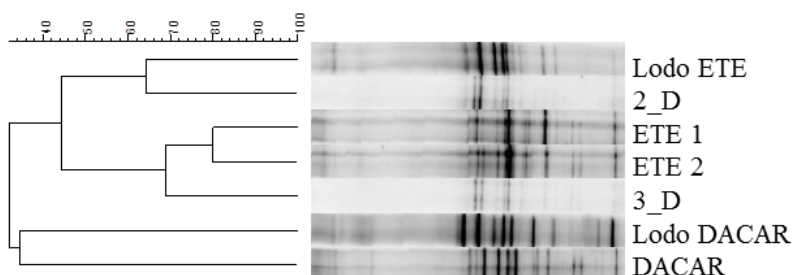
O conceito de diversidade de espécies pode ser entendido a partir do seguinte exemplo proposto por Barros (2007): considerando-se duas comunidades diferentes, retira-se de cada uma delas uma amostra de 100 indivíduos; na primeira comunidade, esses 100 indivíduos estão distribuídos em 10 espécies, sendo que cada espécie apresenta 10 indivíduos; já na amostra da segunda comunidade, também há 10 espécies, porém uma delas apresenta 55 indivíduos, enquanto que as demais espécies apresentam apenas 5 indivíduos. Ao realizar uma amostragem ao acaso, a chance de retirar dois indivíduos que sejam de diferentes espécies é maior na primeira comunidade do que na segunda, portanto a primeira é mais diversa que a segunda, pois apresenta uma distribuição de indivíduos (abundância relativa) mais uniforme, apesar das duas comunidades possuírem a mesma riqueza de espécies (10 espécies).

Embora as arqueas possam estar presentes em um sistema anaeróbio, apresentando diversidade dentro da comunidade (Tabela 11), não há garantia da produção de metano (como ocorreu com os biometanizadores 2, 3, ETE 1 e DACAR) e caso este gás seja produzido, pode estar em uma concentração que inviabiliza o uso do biogás para fins energéticos (como no caso do biometanizador ETE 2).

O índice de Shannon-Wiener representa a diversidade do domínio Archaea, o qual além de ser composto por arqueas metanogênicas, também apresenta arqueas não-metanogênicas. Ou seja, o índice fornece um resultado abrangente, sendo que para se obter informações específicas sobre a presença de metanogênicas, poderiam ser realizadas análises de PCR em tempo real e de sequenciamento genético.

O lodo DACAR apresentou uma maior diversidade de arqueas que o lodo ETE (Tabela 11). Contudo, pode-se dizer que a adaptabilidade do lodo ETE foi melhor que a do lodo DACAR à digestão anaeróbia da FORSU, pois houve produção de metano no biometanizador ETE 2, o qual apresentava as mesmas proporções de inóculo/FORSU/serragem que o biometanizador DACAR (Tabela 6).

Ainda, pode-se notar na Figura 3, que o coeficiente de similaridade entre o biometanizador DACAR e a sua respectiva fonte de inóculo (lodo DACAR) é baixo quanto às arqueas (34%), podendo-se inferir que a maioria das espécies de arqueas presentes no inóculo não encontrou um ambiente adequado para desenvolver-se. Já os biometanizadores inoculados com lodo ETE apresentaram coeficientes de similaridade para arqueas de 44% (ETE 1 e 2; digestato do biometanizador 3) e 64% (digestato do biometanizador 2) com seu respectivo inóculo (Figura 3).



**Figura 3: Análise de Cluster (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de RNAr 16S para o domínio Archaea das amostras de inóculos (lodo ETE e DACAR) e de digestato dos biometanizadores de 50 e 5L. Na referência de cada perfil (à direita), o primeiro número refere-se ao biometanizador – 2 ou 3 e a letra ‘D’ representa ‘digestato’.**

Apesar das inferências mencionadas, vale ressaltar a importância de realizar o teste de Atividade Metanogênica Específica (AME) (AQUINO et al., 2007) e o cálculo do potencial metanogênico (PM) (TEIXEIRA et al., 2009) para os inóculos, auxiliando na escolha daquele que poderá ter uma melhor adaptabilidade ao sistema.

Além de fornecer micro-organismos para a partida do biometanizador, o lodo também é uma fonte de nutrientes e, principalmente, um elemento que auxilia no estabelecimento do efeito tampão do sistema, pois apresenta pH maior que o da FORSU (FORSTER-CARNEIRO et al., 2004). Um dos fatores que propiciaram um ambiente favorável ao desenvolvimento e atividade das metanogênicas no biometanizador ETE 2 foi a manutenção do pH do sistema quando comparado aos biometanizadores de 50 L (Tabela 12). Além das arqueas metanogênicas serem mais sensíveis às condições adversas ou alterações no meio, também possuem taxa de crescimento lenta, sendo que valores de pH inferiores a 6,8 favorecem as acidogênicas e prejudicam a atividade das produtoras de metano, podendo levar à perda total do biometanizador (SOUZA, 1984).

**Tabela 12: Valores de pH dos componentes do substrato e dos digestatos dos biometanizadores de 50 e 5L.**

Componentes do substrato	pH dos componentes do substrato
FORSU	4,67
Serragem	4,29
Lodo ETE	6,86
Lodo DACAR	7,82
Biometanizadores 50 L	pH do digestato dos Biometanizadores 50 L
1	4,28
2	4,21
3	4,70
4	3,75
Biometanizadores 5 L	pH do digestato dos Biometanizadores 5 L
ETE 1	7,71
ETE 2	7,70
DACAR	7,82

A diversidade de bactérias foi maior no digestato que no chorume, demonstrando que a massa em digestão provavelmente apresenta um maior potencial para ser utilizada como inóculo de resíduos frescos. Tal fato pode ser verificado comparando-se, nos biometanizadores de 50 L, o valor do índice H' do digestato (Tabela 11) com o valor do índice H' do respectivo chorume, ambos coletados na amostragem final (135 dias de operação) (Figura 4). Comparando-se a similaridade de espécies do domínio *Bacteria* entre digestato e chorume, o chorume do biometanizador 4 (3ª coleta) foi o que apresentou maior coeficiente de similaridade com seu respectivo digestato (60%) (Figura 5), seguido pelo biometanizador 3, com 48% de similaridade entre as espécies presentes no chorume (3ª coleta) e no digestato.

Ainda quanto ao domínio *Bacteria*, os digestatos dos biometanizadores 2 e 3 apresentaram um coeficiente de similaridade de 66%, enquanto que os digestatos dos biometanizadores 1 e 4 obtiveram uma similaridade de 64% entre si. Quando comparados esses dois grupos (2 e 3; 1 e 4), verifica-se que a similaridade entre eles é baixa (32%), principalmente devido ao fator inoculação no primeiro grupo (Figura 5).

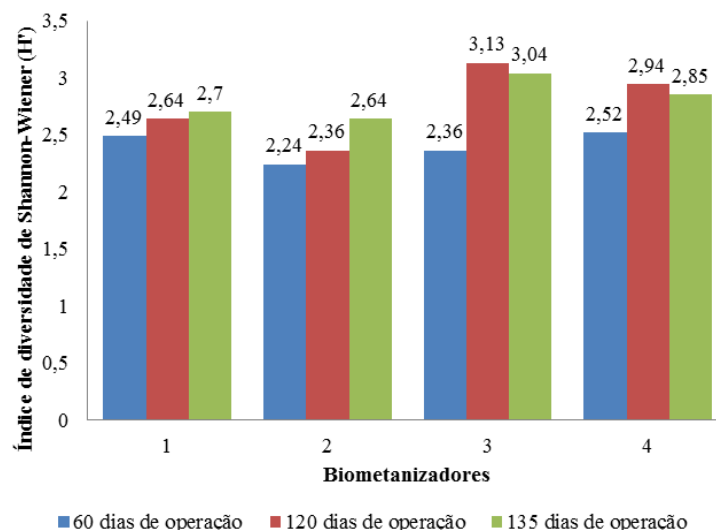


Figura 4: Caracterização do domínio *Bacteria* presente no chorume dos biometanizadores de 50 L pelo índice de diversidade de *Shannon-Wiener*.

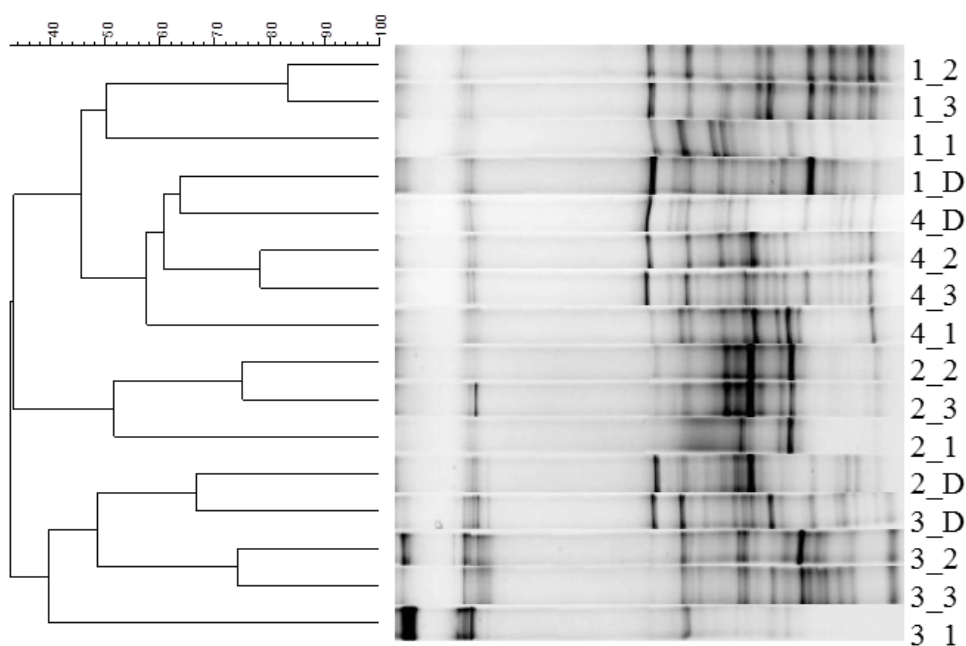


Figura 5: Análise de *Cluster* (Jaccard, UPGMA) do perfil das bandas de DGGE dos fragmentos de RNAr 16S para o domínio *Bacteria* das amostras de chorume e de digestato dos biometanizadores de 50 L. Na referência de cada perfil (à direita), o primeiro número refere-se ao biometanizador – 1, 2, 3 ou 4 e o segundo número à coleta – 1ª (1), 2ª (2) ou 3ª (3), sendo que a letra “D” representa “digestato”.



## CONCLUSÕES

É possível tratar a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos e gerar metano a partir do processo de biometanização, porém, devido o processo envolver uma diversidade de micro-organismos que são interdependentes entre si, torna-se fundamental o conhecimento e entendimento da comunidade microbiana em conjunto com as variáveis ambientais interferentes.

O lodo de esgoto de reator UASB é uma alternativa de inóculo do processo de biometanização, pois contém uma comunidade microbiana diversificada, incluindo metanogênicas, com potencial adaptabilidade às condições adversas da digestão anaeróbia da FORSU, que se apresentam, sobretudo, na partida.

A própria massa de resíduos (digestato) que sai do biometanizador tem potencial para ser utilizada como inóculo dos resíduos frescos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRELPE - Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil**. 2012. Disponível em: <<http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2012.pdf>>. Acesso em: 21 de setembro de 2013.
2. ABRELPE - Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2013.pdf>>. Acesso em: 06 de março de 2015.
3. AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. de L. F. dos; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007.
4. AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.
5. BORGLIN, S. E.; HAZEN, T. C.; OLDENBURG, C. M. Comparison of aerobic and anaerobic biotreatment of municipal solid waste. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 54, p. 815-822, 2004.
6. BRASIL. Lei nº 12.305, 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 de agosto de 2010.
7. CASTANHEIRA, L.; FERREIRA, V.; LOPES, C. ENERGAIA – Energia e desenvolvimento sustentável na região Norte. **Valorização de resíduos orgânicos**. Portugal, [200?], 35 p.
8. FIESP - Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. **Perguntas frequentes sobre Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS)**. Departamento de Meio Ambiente, São Paulo: 2012. 30 p.
9. FORSTER-CARNEIRO, T.; FERNÁNDEZ, L.A.; PÉREZ, M. G.; ROMERO, L.I.G.; ÁLVAREZ, C. J.; SALES, D. **Biometanización de la fracción orgánica del residuo sólido urbano: proceso SEBAC**. 2004. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/mudancasclimaticas/biogas/file/docs/artigos\\_dissertacoes/8\\_foster\\_fernandez\\_perez\\_romero\\_sales.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/mudancasclimaticas/biogas/file/docs/artigos_dissertacoes/8_foster_fernandez_perez_romero_sales.pdf)>. Acesso em: 04 de maio de 2015.
10. FRICKE, K.; SANTEN, H.; WALLMANN, R.; HÜTTNER, A.; DICHTL, N. Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. **Waste Management**, v. 27, p. 30-43, 2007.
11. GOMES, F. C. de S. P. **Biometanização seca de RSU** – Estado da arte e análise crítica das principais tecnologias. 2010. 199f. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade Socioeconômica e Ambiental) – Núcleo de Pesquisas em Recursos Hídricos – Pró-Água, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2010.
12. KHALID, A.; ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. **Waste Management**, n. 31, p. 1737-1744, 2011.
13. KUDO, N.; KHOCHBIN, S.; NISHI, K.; KITANO, K.; YANAGIDA, M.; YOSHIDA, M.; HORINOCHI, S. Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of Mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 29742-29751, 1997.

14. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.
15. NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.19, p.5636-5643, 1996.
16. PARKIN, G. F.; OWEN, W. F. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. **Journal of Environmental Engineering**, n. 112, p. 867-920, 1986.
17. PEREIRA NETO, T. J. A Política Nacional de Resíduos Sólidos: os reflexos nas cooperativas de catadores e a logística reversa. **Revista Diálogo**, n. 18, p. 77 – 96, 2011.
18. REICHERT, G. A. Aplicação da digestão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos: uma revisão. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23., 2005, Campo Grande/MS. **Anais...**Campo Grande: ABES, 2005, p. 1-16.
19. SINGHAL, Y.; BANSAL, S. K.; SINGH, R. Evaluation of biogas production from solid waste using pretreatment method in anaerobic condition. **International Journal of Emerging Sciences**, v. 2, n° 3, p. 405-414, 2012.
20. SOUZA, M. E. de. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. **Revista DAE**, v. 44, n. 137, p. 88-94, 1984.
21. TEIXEIRA, A. R.; CHERNICHARO, C. A. de L.; SOUTO, T. F. da S.; PAULA, F. S. de. Influência da alteração da distribuição do tamanho de partículas no desempenho de reator UASB tratando esgoto doméstico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 2, p. 159-166, 2009.
22. VAN BUREN, A. (ed.). **A Chinese biogas manual**. London: Intermediate Technology Publications, 1979. 135p.