

**Bem-vindo(a)!** Este guia irá conduzi-lo passo a passo na execução de um teste de Potencial Bioquímico de Metano (BMP) usando o sistema automatizado AMPTS III. Vamos focar na clareza e nas boas práticas para garantir resultados confiáveis.

O **Sistema Automático de Teste de Potencial de Metano III** (*Automatic Methane Potential Test System III – AMPTS III*) é uma plataforma analítica consolidada para a realização de testes de fermentação anaeróbia em batelada, desenvolvida pela **BPC Instruments**. Este sistema conta com recursos da geração anterior (AMPTS II) e uma série de melhorias e desenvolvimentos em todos os diferentes componentes do equipamento.

## AMPTS<sup>®</sup> III

Anaerobic batch fermentation test systems



## Visão Geral do AMPTS III

### How AMPTS III Works

#### UNIT A: REACTOR & INCUBATION UNIT

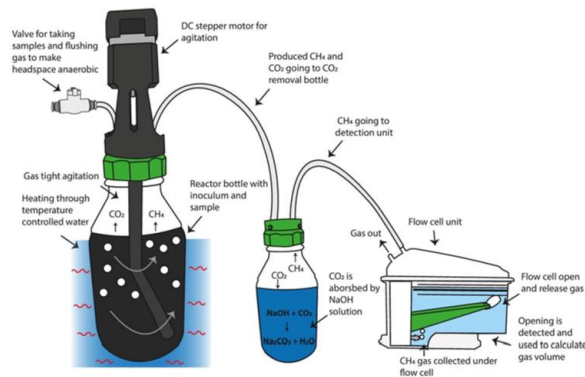
In the first stage of the process, inoculum and substrate are incubated at anaerobic conditions. Our thermostatic water bath allows you to incubate different temperatures. Biogas is produced ( $\text{CO}_2$  and  $\text{CH}_4$ ).

#### UNIT B: $\text{CO}_2$ ABSORPTION UNIT

Biogas goes to the  $\text{CO}_2$  absorption unit, where  $\text{CO}_2$  is absorbed by an alkaline solution ( $\text{NaOH}$ ).  $\text{CH}_4$  remains and goes to our detection unit.

#### UNIT C: DETECTION UNIT

Gas ( $\text{CH}_4$ ) enters to flow cell unit and is measured. Data is stored on our BPC Core AMPTS unit and can be accessed via a computer or internet connection.



O sistema é composto por três partes principais:

1. **Unidade de Digestão (unidade de incubação):** Banho-maria com agitação para os frascos de reação.
2. **Unidade de Absorção de  $\text{CO}_2$ :** O AMPTS III apresenta um avanço importante em relação ao modelo anterior (AMPTS II) no processo de remoção de  $\text{CO}_2$ . Agora, o equipamento conta com dois suportes que comportam até nove frascos cada, o que facilita a organização e proporciona maior flexibilidade durante os ensaios. Outro diferencial é o aumento da capacidade dos frascos de absorção de  $\text{CO}_2$ , que passaram de 100 mL no modelo antigo para 250 mL no novo design. Isso significa que o sistema pode lidar com volumes maiores de gás, reduzindo a necessidade de trocas frequentes e tornando os experimentos mais eficientes e contínuos.
3. **Unidade de Medição (Células de Gás) e o Software:** O AMPTS III foi desenvolvido com uma série de inovações que tornam sua operação mais prática, precisa e eficiente. Cada célula de fluxo agora está protegida por uma câmara individual, que pode ser substituída de forma simples e sem ferramentas, garantindo maior facilidade de manutenção. O equipamento oferece duas resoluções de medição (2 e 9 mL) e conta com uma eletrônica atualizada que proporciona respostas mais rápidas e estáveis, além de uma capacidade de armazenamento 150 vezes superior à da versão anterior (AMPTS II). Para o usuário, o sistema inclui recursos modernos como tela OLED para

visualizar status e IP, acelerômetro para nivelamento automático, botão liga/desliga, porta USB para atualizações de software e a possibilidade de redefinição de fábrica. A nova plataforma de software **Aurora™** traz ainda mais funcionalidades, permitindo iniciar ou parar todos os canais com um clique, aplicar três tipos de normalização e configurar visualizações e relatórios de dados de forma intuitiva.



Figure 1. AMPTS III Complete System.

**Unit A – Incubation Unit**

20 glass reactors (0.5 or 1 L)	1 motor controller signal cable	1 MCU power adapter
18 brushless DC motors 1 motor power splitter	18 axis couplings for brushless DC motors	1 thermostatic water bath 1 base tray
19 brushless DC motor cables 250 mm (15 units) 500 mm (3 units) 1500 mm (1 unit)	20 stirrers GL 45 (0.5 or 1 L) standard	1 thermostatic water bath lid for 18 reactors (0.5 or 1 L)
	1 motor controller unit (MCU)	20 push-in valves 6 mm

**Unit B – CO<sub>2</sub>-absorption Unit**

2 bottle holders 9 x 250 mL	20 bottle nuts GL 45
20 glass bottles (250 mL)	20 lids GL 45

**Unit C – BPC Core AMPTS Unit**

1 BPC Core AMPTS	40 check valves	1 main unit power adapter
20 flow cell units (FCUs)	1 plastic syringe	1 ethernet cable

**Additional Components**

1 Festo tubing 50 m	40 push-in connectors 6 mm	1 bottle/tube opening tool
1 funnel	12 soft binders 7/180 mm	FCU volume sheet (2 or 9 mL)
20 tubing stoppers	40 multi-coloured marker clamps	

**Princípio:** Microrganismos anaeróbios (inóculo) digerem a matéria orgânica (substrato) produzindo biogás ( $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ ). O  $\text{CO}_2$  é removido por uma solução alcalina, e o volume de metano restante é medido automaticamente pelas células de gás.

### Preparação das Soluções para Remoção de $\text{CO}_2$

#### Preparar solução de NaOH 3 mol/L.

As garrafas de 250 mL devem ser preenchidas com 200 mL da solução alcalina, o que torna necessário adicionar **3,6 L** e **1,8 L** de NaOH 3 mol/L para **18** e **9** garrafas de vidro, respectivamente.

Após pesar **432 g** (para 18 garrafas) ou **216 g** (para 9 garrafas) de pastilhas de NaOH, misture com aproximadamente **3/4 do volume total necessário de água destilada**.

A geração de calor após a dissolução do NaOH em água é alta, portanto recomenda-se adicionar pequenas quantidades suplementares de água, seguidas de agitação. Quando o NaOH estiver completamente dissolvido, adicione a quantidade restante de água até atingir o volume total (3,6 ou 1,8 L).

Prepare **0,4% de timolftaleína** dissolvendo **40 mg em 9 mL de etanol**, seguido por **1 mL de água**. Misture essa solução com a solução de NaOH 3 mol/L.

Após adicionar **200 mL de NaOH 3 mol/L com indicador de pH** em cada garrafa, coloque-as no suporte para garrafas.

## FASE 1: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS (A Base de Tudo)

Antes de tocar no equipamento, é crucial caracterizar o inóculo e o substrato. A carga orgânica do ensaio será baseada nos **Sólidos Voláteis (SV)**.

### A. Análise de Sólidos Voláteis (SV) - Standard Methods 2540 B & E

**Objetivo:** Determinar a fração orgânica (o "alimento" para os microrganismos) do inóculo e do substrato.

**Materiais:** Estufa (105°C), Mufla (550°C), cadinhos de porcelana ou metal, dessecador, balança analítica.

#### Procedimento Passo a Passo:

##### 1. Preparação do Cadinho:

- Limpe um cadinho e leve-o à mufla a 550°C por 1 hora para eliminar qualquer resíduo orgânico.
- Deixe esfriar no dessecador e pese na balança analítica. Anote este peso como **Peso do Cadinho (PC)**.

##### 2. Determinação de Sólidos Totais (ST):

- Adicione uma quantidade conhecida da amostra homogeneizada (ex.: 10-20 g de substrato, 30-50 g de inóculo) dentro do cadinho tarado. Pese novamente. Anote como **Peso do Cadinho + Amostra Úmida (PCU)**.
- Leve o cadinho com a amostra para a estufa a **105 °C** por, no mínimo, 24 horas (ou até peso constante).
- Retire da estufa, deixe esfriar no dessecador e pese. Anote como **Peso do Cadinho + Amostra Seca a 105°C (PCS)**.

- **Cálculo de ST:**

$$ST (\%) = [(PCS - PC) / (PCU - PC)] * 100$$

##### 3. Determinação de Sólidos Voláteis (SV):

- Após a pesagem a 105°C, leve o mesmo cadinho com a amostra seca para a mufla a **550 °C** por 2 horas.
- Retire com cuidado, deixe esfriar no dessecador e pese. Anote como **Peso do Cadinho + Cinzas (PCC)**.

○ **Cálculo de SV:**

$$SV (\%) = [(PCS - PCC) / (PCU - PC)] * 100$$

*Ou simplesmente:  $SV = ST - SF$  (Sólidos Fixos).*

**B. Cálculo da Razão Inóculo/Substrato (I/S) conforme VDI 4630**

A norma recomenda uma **razão I/S entre 2 e 4**, em base de SV. Isso garante que haja microrganismos suficientes para digerir o substrato sem causar inibição.

- **Fórmula:**  $I/S = (\text{Massa de SV do Inóculo}) / (\text{Massa de SV do Substrato})$

**Exemplo Prático:**

- Você decidiu usar **400 g** de inóculo por frasco.
- A análise mostrou que seu inóculo tem **2% de SV**.
- **Massa de SV do Inóculo:**  $400 \text{ g} * 0,02 = 8 \text{ g de SV}$ .
- Para uma razão  $I/S = 2$ , a massa de SV do substrato deve ser:  $8 \text{ g} / 2 = 4 \text{ g de SV}$ .
- Se seu substrato tem **80% de SV**, a massa de substrato (base úmida) a ser adicionada é:  $4 \text{ g} / 0,80 = 5 \text{ g}$ .

**Prepare as seguintes condições experimentais em triplicata (3 frascos para cada):**

1. **Branco (Controle Negativo):** Apenas inóculo + água. (Ex.: 400 g inóculo + água até o volume final).
2. **Controle Positivo (Celulose):** Inóculo + quantidade conhecida de celulose microcristalina (padrão). (Ex.: 400 g inóculo + massa de celulose equivalente a 4 g de SV + água).
3. **Amostra (Substrato Teste):** Inóculo + substrato a ser testado. (Ex.: 400 g inóculo + 5 g de substrato + água).

## FASE 2: PREPARAÇÃO DOS FRASCOS E CONFIGURAÇÃO DO AMPTS III

### A. Preenchimento dos Frascos de Digestão (Reatores)

1. **Pese o Frasco Vazio:** Pese o frasco de vidro de 1 L com a tampa e o septo.
2. **Adicione os Componentes:** Adicione sequencialmente no frasco:
  - O **inóculo** (pesado conforme cálculo).
  - O **substrato** (pesado com precisão).
  - **Água destilada/desionizada** para completar o volume de trabalho. A VDI 4630 recomenda que o *headspace* (espaço livre) seja de **20-40%** do volume total. Para um frasco de 1 L, um volume de trabalho de 600-800 mL é ideal.
3. **Verifique o pH:** O pH final da mistura deve estar entre **7,0 e 8,5**. Ajuste com soluções diluídas de NaOH ou HCl, se necessário.
4. **Pese o Frasco Cheio:** Esta pesagem é crítica para o cálculo de volume de gás pelo software.

### B. Purgagem com Nitrogênio (N<sub>2</sub>) - Criação da Atmosfera Anaeróbia

**Objetivo:** Remover todo o oxigênio do *headspace* para garantir condições estritamente anaeróbias.

1. Feche bem o frasco com a tampa (o septo de borracha/butilo deve vedar perfeitamente).
2. Insira **duas agulhas** no septo:
  - **Agulha de Ingresso de N<sub>2</sub>:** Conectada à mangueira de fluxo de nitrogênio.
  - **Agulha de Exaustão:** Aberta para a atmosfera, mas com a ponta submersa em um béquer com água para servir como válvula de segurança e visualizador de fluxo.
3. Abra o fluxo de N<sub>2</sub> de forma suave e constante. Você verá bolhas saindo pela agulha de exaustão dentro da água.
4. **Purgue por pelo menos 3-5 minutos.** Isso garante que todo o ar seja expulso e substituído por N<sub>2</sub>.
5. **Sequência de Remoção Correta (IMPORTANTE):**

- Primeiro, remova a **agulha de exaustão**. Isso impede que o ar seja sugado de volta para o frasco.
- Imediatamente depois, remova a **agulha de ingresso de N<sub>2</sub>**. O frasco agora está selado e com atmosfera inerte.

### C. Preparo do Frasco de Medição (para Absorção de CO<sub>2</sub>)

1. Para cada frasco de digestão, há um frasco de medição menor.
2. Encha este frasco com a **solução de NaOH 3-4 M** (cerca de 200-300 mL). *Cuidado: Use óculos e luvas, pois NaOH é corrosiva.*
3. Adicione algumas gotas de **indicador de pH (ex.: fenolftaleína ou azul de bromotimol)**. A cor servirá como alerta visual quando a solução estiver saturada de CO<sub>2</sub> e precisar ser trocada (geralmente fica amarela/incolor).

### FASE 3: CONFIGURAÇÃO INICIAL NO SOFTWARE E INÍCIO DO ENSAIO

#### 1. Conexão Física:

- Coloque os frascos de digestão no banho-maria do AMPTS III.
- Conecte as tubulações de gás de cada frasco de digestão ao seu respectivo frasco de medição.
- Verifique se **todas as conexões estão apertadas** para evitar vazamentos.

#### 2. Configuração do Software AMPTS:

- Abra o software e crie um novo experimento.
- **Cadastro dos Reatores:** Para cada posição no equipamento, registre:
  - **Nome** (ex., "Branco\_1", "Celulose\_2", "AmostraX\_3").
  - **Peso Total do Frasco** (obtido após o enchimento e purga).
  - **Tipo de Controle:** Selecione "Branco" para os controles negativos.
- **Configurações de Operação:**
  - **Temperatura do Banho:** Defina para **37 °C** (condição mesofílica da VDI 4630).
  - **Agitação:** Configure ciclos (ex., agitar 60 segundos a cada 10 minutos).
  - **Tempo de Experimento:** Defina para, no mínimo, 21 dias.
- **Procedimento de "Tara" ou "Zero Inicial":** Esta etapa é crucial! Após conectar os frascos e estabilizar a temperatura, o *headspace* contém nitrogênio da purga. O software possui uma função (como "Set Initial Value" ou "Zero Adjustment") para definir o volume de gás atual como zero. **Execute esta função para cada célula de medição.** Isso garantirá que apenas o biogás produzido *após* o início do experimento seja medido.

- #### 3. Início do Experimento:
- Após toda a configuração e verificação, inicie o experimento pelo software. O banho aquecerá, a agitação começará e o sistema iniciará a medição.

### FASE 4: MONITORAMENTO DURANTE OS 21 DIAS DE ENSAIO

A qualidade do ensaio depende da vigilância durante estas três semanas.

---

**Pontos de Atenção Críticos:**

1. **Vazamentos:** Diariamente, verifique visualmente se há bolhas passando pelas células de medição em um ritmo constante. Uma parada súbita ou fluxo anormal pode indicar vazamento.
2. **Saturação da Solução de NaOH:** Observe a cor do indicador nos frascos de medição. Se a cor mudar (ex., de azul/roxo para amarelo/incolor), a solução está saturada e **deve ser trocada imediatamente** para não comprometer a absorção de CO<sub>2</sub>. Anote a data e o volume de gás medido até o momento da troca; o software permite pausar a medição para esta operação.
3. **Atividade dos Reatores:** No gráfico do software, a produção de metano do **Controle Positivo (Celulose)** deve começar a subir significativamente após alguns dias. Se não subir, pode haver problema com o inóculo.
4. **Temperatura:** Confirme periodicamente que a temperatura do banho-maria está estável em 37 °C ± 1°C.
5. **Anotações:** Mantenha um diário de laboratório detalhando qualquer evento anormal, troca de solução, ajustes, etc.

## FASE 5: ENCERRAMENTO DO ENSAIO E ANÁLISE FINAL

1. **Critério de Parada:** O ensaio pode ser finalizado após 21 dias se a produção diária de metano for inferior a 1% da produção total acumulada por 3 dias consecutivos.
2. **Desmontagem:**
  - Pare o experimento no software.
  - Desconecte cuidadosamente as tubulações de gás.
  - Retire os frascos de digestão do banho-maria.
3. **Análise Final de SV (Opcional, mas Muito Recomendada):**
  - Meça o teor de **SV do conteúdo de cada frasco APÓS** os 21 dias de digestão, seguindo o mesmo método da Fase 1.
  - **Cálculo da Redução de SV:**  
$$\% \text{ Redução de SV} = [(SV_{\text{inicial}} - SV_{\text{final}}) / SV_{\text{inicial}}] * 100$$
  - **Correlação com a Produção de Metano:** Uma alta redução de SV deve correlacionar-se com uma alta produção de metano. Você pode calcular a eficiência da conversão da matéria orgânica degradada em metano. De acordo com a estequiometria bioquímica, 1 g de SV degradado teoricamente produz cerca de 350 a 400 mL de CH<sub>4</sub> em condições padrão. Compare este valor teórico com o seu resultado experimental para validar o ensaio.
4. **Cálculo do BMP Final:**
  - O software do AMPTS III fornecerá o volume cumulativo de metano para cada reator.
  - **Fórmula do BMP:**  
$$\text{BMP (LN CH}_4 \text{ / kg SV}_{\text{adicionado}}) = [\text{Volume CH}_4 \text{ (Amostra)} - \text{Volume CH}_4 \text{ (Branco)}] / (\text{Massa de SV do Substrato no frasco, em kg})$$
  - O resultado final é a média das triplicatas. O desvio padrão entre elas deve ser baixo (<5%).

### Validação do Ensaio:

- **Controle Positivo (Celulose):** O BMP da celulose deve estar próximo do valor teórico (~350-400 LN CH<sub>4</sub>/kg SV). Caso contrário, o ensaio é inválido.

- **Controle Negativo (Branco):** A produção de metano do branco deve ser baixa, confirmando que o inóculo não contribuiu significativamente para a digestão do substrato teste.

## Referências

1. **Manual do Usuário do AMPTS II/III:** Documento mais importante, fornecido pela BPC Instruments. Contém detalhes específicos de operação do software e manutenção.
2. **VDI 4630:2016 - "Fermentation of organic materials - Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests"**. Norma alemã que padroniza o teste de BMP.
3. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition** - Métodos 2540 B e E para Sólidos Totais e Voláteis.
4. **Angelidaki, I., et al. (2009).** "Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays." *Water Science and Technology*. Um artigo clássico sobre protocolos de BMP.