

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,  
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**‘DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS  
ALIMENTARES: EFEITO DA CARGA  
ORGÂNICA E DA ADIÇÃO DE ELEMENTOS  
TRAÇO SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO E A  
DIVERSIDADE MICROBIANA’**

**Alessandra da Silva Martins**

Belo Horizonte-MG

2018

**‘DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS  
ALIMENTARES: EFEITO DA CARGA  
ORGÂNICA E DA ADIÇÃO DE ELEMENTOS  
TRAÇO SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO  
E A DIVERSIDADE MICROBIANA’**

**Alessandra da Silva Martins**

**Alessandra da Silva Martins**

**‘DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS  
ALIMENTARES: EFEITO DA CARGA  
ORGÂNICA E DA ADIÇÃO DE ELEMENTOS  
TRAÇO SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO E A  
DIVERSIDADE MICROBIANA’**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Calábria de Araújo

Co orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Carlos Augusto L. Chernicharo

Belo Horizonte-MG

Escola de Engenharia da UFMG

2018

M386d

Martins, Alessandra da Silva.

Digestão anaeróbia de resíduos alimentares [manuscrito] : efeito da carga orgânica e da adição de elementos traço sobre a produção de metano e a diversidade microbiana / Alessandra da Silva Martins. – 2018. xi, 156 f., enc.: il.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.

Coorientador: Carlos Augusto L. Chernicharo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices e anexos: f. 121-155.

Bibliografia: f. 112-120.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses. 3. Biogás - Teses. 4. Digestão anaeróbia - Teses. I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Chernicharo, Carlos Augusto Lemos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte - BRASIL

Telefax: 55 (31) 3409-1882 - posgrad@desa.ufmg.br

<http://www.smarh.eng.ufmg.br>

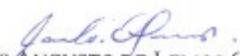
## FOLHA DE APROVAÇÃO

“Digestão Anaeróbia de Resíduos Alimentares: Efeito da Carga Orgânica e da Adição de Elementos Traço Sobre a Produção de Metano e a Diversidade Microbiana”

**ALESSANDRA DA SILVA MARTINS**

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

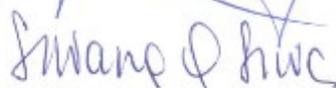
  
Prof. JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO

  
Prof. CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHARO

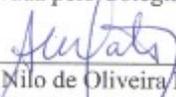
  
Prof. MARCOS VON SPERLING

  
Prof. CLÁUDIO LEITE DE SOUZA

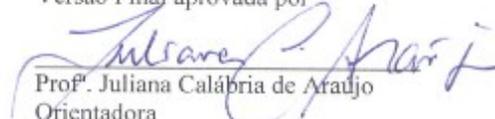
  
Prof. ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA

  
Prof. SILVANA DE QUEIROZ SILVA

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

  
Prof. Nilo de Oliveira Nascimento  
Coordenador

Versão Final aprovada por

  
Prof. Juliana Calábria de Araújo  
Orientadora

Belo Horizonte, 27 de abril de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus por seu amor. A real presença do amigo fiel, Espírito Santo que orienta e conduz a minha vida com renovo de minha mente e de minhas forças. Até aqui 'me' ajudou o Senhor! (I Samuel 7:12).

Ao Rafael, parceiro que me acompanhou nessa caminhada com incentivos para não desistir da caminhada e superar os obstáculos.

Aos meus familiares, minha preciosa mãe que tanto incentivou a não desistir e lutou para a continuidade e finalização do curso. Ao meu pai que ri e chora comigo porque estamos juntos. Meus irmãos Marcio e Adriana que também contribuíram com amor, companheirismo e incentivos. Sofia minha sobrinha, o fato de existir me faz feliz. E a minha cadelinha Mabel por seu companheirismo, amor e fidelidade de esperar por mim. Mabel, a possessiva.

A minha amada amiga Lectícia por me acolher em seus braços com afeto, carinho e conselhos. Amigos que mesmo com a distância torcem e se preocupam comigo, Nocy, Laura, Rejanne, Simone, Luize Natália, família que amo!

À Najla minha amigona para tudo, inclusive confidências. Obrigada francesa baiana por sua acolhida em todos os termos.

A minha amiga Neiva por nossas conversas e conselhos. Amizade para sempre!

Aos meus líderes espirituais que também contribuíram com seus conselhos, orações e incentivos, pastor Ricardo Alexandre, Kelly, missionária Solimar, pastora Rose, bispo Elisiário, pastor Wladimir, missionária Cláudia, Maria, irmã Socorro, irmã Lídia.

À minha querida orientadora professora Juliana pela oportunidade concedida, incentivos a não desistir e principalmente pela paciência. Acredito que aprendemos muito uma com a outra. Amo você professora! Ao meu co orientador, querido professor Carlos Chernicharo, foi um privilégio estarmos juntos. Muito obrigada pelas oportunidades.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação pelo ensino, dedicação e conhecimento ministrados nas disciplinas do curso.

À empresa Methanum pela colaboração da equipe nos trabalhos desenvolvidos. Ao Weber que muito nos ajudou quando precisamos. Aos companheiros do Centro de Estudos Rioterra Alexis, Fabiana, Telva, Fred e Alexandre pela amizade, apoio e incentivos.

Às amigas do laboratório de microbiologia Cíntia pela ajuda que nos dá; Alyne, amiga para todos os momentos; Elayne, amiga do coração; Erika pela amizade; Luyara, pela companhia e conversas; Brenda, pela amizade e pelo software; Cássia 'alternativa', obrigada pela grande ajuda no momento mais tenso e pela plantinha, levarei comigo; Bruna, pela amizade e companhia nos finais de semana e momentos do lanche; Marcela, companheira, amiga

especial.

A minha amigona do coração, Taiana, por nossos momentos juntas, companheira de sair altas horas do DESA. Jesus cuida de nós!!!

Aos técnicos do DESA, Cíntia, Luciane, Érico e Gabriel, por todo suporte. Gratidão!

A toda equipe da Plataforma de Metanização Quarteirão 10, Claudinei, Lucas, Juliana, Anderson, Tiago, Andrés Felipe pela contribuição, apoio e cuidado da planta.

Ao Bernardo pelo companheirismo de uma etapa do trabalho. Juntos somos mais fortes! Muito obrigada!

Aos seguranças das portarias dos prédios e do estacionamento pelos cuidados, dando proteção e fazendo vigilância a minha pessoa. E a todos os funcionários da Escola de Engenharia que influenciaram de forma direta ou indiretamente neste trabalho, a exemplo, do Walney querido motorista.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e apoio financeiro.

## RESUMO

O resíduo alimentar, importante fração dos resíduos sólidos urbanos (RSU) é considerado uma fonte renovável de energia, com potencial para geração de metano. Este trabalho investigou, em uma primeira etapa, os efeitos do aumento da carga orgânica aplicada a um digestor anaeróbio (de 18,8 m<sup>3</sup>) tratando resíduo alimentar sobre a composição e diversidade da comunidade microbiana. O digestor foi operado em três fases operacionais de acordo com a taxa de carga orgânica volumétrica (COV) aplicada: fase I (1,2 a 1,7 kg SV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); fase II (1,0 a 2,4 kg de SV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); e fase III (1,0 a 1,7 kg SV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Ao longo destas fases, foram monitorados parâmetros físico-químicos (pH, relação AI/AP, volume de metano produzido e as concentrações de sólidos), bem como microbiológicos como a diversidade da comunidade de bactérias e arqueias através do sequenciamento de nova geração. Na segunda etapa, este trabalho avaliou (em frascos-reatores de 0,6 L) o efeito da adição de diferentes concentrações de elementos traço (Co, Mo, Fe e Ni), em separado e em conjunto, sobre a digestão anaeróbia dos resíduos alimentares. Foram avaliados os efeitos da adição dos elementos traço e das razões substrato: inóculo (S/I) de 0,5 e 1,5, sobre o potencial de produção de metano bem como sobre a composição e diversidade da comunidade microbiana. Os resultados de monitoramento do biodigestor mostraram estabilidade no desempenho quanto ao rendimento de metano com COV variando de 1,0 a 2,4 kg SV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (fases I e II), comparado com a fase III (1,0-1,5 kg SV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) quando o resíduo alimentar apresentou maior acidez. Os resultados do sequenciamento revelaram alterações na composição da comunidade microbiana em cada fase operacional. Os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram favorecidos, enquanto a abundância de *Proteobacteria* e *Chloroflexi* diminuiu com maior COV indicando que as bactérias fermentadoras/ hidrolíticas foram selecionadas nessa condição. A composição da comunidade metanogênica sofreu alterações em resposta às mudanças na COV. *Methanosaeta* e *Methanospirillum* dominaram em condições de baixa COV indicando a importância das metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas para a produção de metano nessa condição. *Methanosaeta* quase desapareceu em condições de elevada COV, enquanto *Methanoculleus* foi favorecido. As bactérias sintróficas estavam em alta abundância (> 9%) indicando que foram importantes para a produção de metano. As interações sintróficas entre bactérias produtoras de hidrogênio (*Syntrophomonas* e *Desulfosporosinus*) e metanogênicas hidrogenotróficas foram evidenciadas com elevada COV. Na segunda etapa, os resultados mostraram que a adição de ferro (5,0 mg/L), e níquel (1,0mg/L) em separado e a adição da combinação de Co, Fe, e Ni (1,0, 5,0 e 0,5 mg/L) tiveram efeito positivo resultando no incremento da produção de metano a partir da degradação do resíduo alimentar. Os resultados do sequenciamento mostraram que a adição dos elementos traço aumentou a abundância das metanogênicas, tanto acetoclásticas *Methanosaeta*, quanto hidrogenotróficas *Methanospirillaceae*, quando o reator foi operado com a relação substrato:inóculo (S/I) de 1,5. Para a razão S/I (0,5), a adição de elementos traço não alterou a abundância relativa da maioria dos filos detectados *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Euryarchaeota*. Este trabalho demonstrou o efeito positivo da adição de elementos traço sobre a digestão anaeróbia, mas o tipo de metal adicionado e as concentrações foram importantes. Cobalto, ferro e níquel nas maiores concentrações tiveram efeito combinado e negativo sobre a comunidade de metanogênicas. Mas, a adição de ferro e cobalto teve efeito positivo sobre a comunidade de bactérias. A adição de molibdênio teve efeito significativo superior (51 a 69%, S/I 1,5) a produção de metano em combinação com ferro e níquel, comparado com a combinação de cobalto, ferro e níquel (7,5 a 64%, S/I 1,5). Portanto, a adição dos elementos traço influenciou no desempenho do digestor alterando a composição e estrutura da comunidade de bactérias e arqueias e, conseqüentemente, na produção de metano.

**Palavras-Chave:** arqueias metanogênicas, bactérias sintróficas, sequenciamento de nova geração e biogás.

## ABSTRACT

Food waste, a significant fraction of urban solid waste (MSW), is considered a renewable source of energy with potential for methane generation. This work investigated, in a first stage, the effects of the increase of the organic load applied to an anaerobic digester (of 18.8 m<sup>3</sup>) treating food residue on the composition and diversity of the microbial community. The digester was operated in three operational phases according to the volumetric organic loading rate (OLR): phase I (1.2 to 1.7 kg VS L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>); phase II (1.0 to 2.4 kg of VS L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>); and phase III (1.0 to 1.7 kg VS L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). Throughout these phases, physico-chemical parameters (pH, AI /AP relation and solids) and the new generation sequencing of the microbial community were monitored as well as microbiological diversity of the bacterial and archaea community through new generation sequencing. In the second step, this work evaluated (in 0.6 L flasks) the effect of the addition of different concentrations of trace elements (Co, Mo, Fe and Ni), separately and together, on the anaerobic digestion of residues food. The effects of the addition of the trace elements and substrate: inoculum (S/I) ratios of 0.5 and 1.5 on the potential of methane production as well as on the composition and diversity of the microbial community were evaluated. The results of the monitoring of the biodigester showed a stability in the performance of methane yield with OLR ranging from 1.0 to 2.4 kg VS L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (phases I and II), compared to phase III (1.0 -1.5 kg VS L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) when the food residue presented higher acidity. Sequencing results revealed changes in microbial community composition at each operational stage. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were favored, while the abundance of *Proteobacteria* and *Chloroflexi* decreased with higher OLR indicating that the fermenting / hydrolytic bacteria were selected in this condition. The composition of the methanogenic community underwent changes in response to changes in OLR. *Methanosaeta* and *Methanospirillum* dominated under conditions of low OLR indicating the importance of the methanogenic hydrogenotrophic and acetoclastic for the production of methane in this condition. *Methanosaeta* almost disappeared under high OLR conditions, while *Methanoculleus* was favored. *Synthetic* bacteria were in high abundance (> 9%) indicating that they were important for methane production. The syntrophic interactions between hydrogen producing bacteria (*Syntrophomonas* and *Desulfosporosinus*) and hydrogenotrophic methanogens were evidenced with high OLR. In the second step, the results showed that the addition of iron (5.0mg /L) and nickel (1.0mg /L) separately and the combination of Co, Fe, and Ni (1.0, 5.0 and 0.5 mg /L) had a positive effect resulting in increased methane production from the degradation of feed residue. The results of the sequencing showed that the addition of trace elements increased the abundance of the methanogenic, both acetoclastic *Methanosaeta*, and hydrogenotrophic *Methanospirillaceae*, when the reactor was operated with the ratio substrate: inoculum (S/I) of 1.5. For the S/I ratio (0.5), the addition of trace elements did not alter the relative abundance of most of the detected phyla, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* and *Euryarchaeota*. This work demonstrated the positive effect of the addition of trace elements on anaerobic digestion, but the type of metal added and the concentrations were significant. Cobalt, iron and nickel in the highest concentrations had a combined and negative effect on the methanogenic community. But, the addition of iron and cobalt had a positive effect on the bacterial community. The addition of molybdenum had a significant higher effect (51 at 69%, S/I 1.5) of the production of methane in combination with iron and nickel, compared to the combination of cobalt, iron and nickel (7.5 to 64%, S/I 1.5). Therefore, the addition of trace elements influenced the performance of the digester by altering the composition and structure of the community of bacteria and arches and, consequently, the production of methane.

**Key-words:** methanogenic arqueas, syntrophic bacteria, new generation sequencing and biogas.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Aplicação da Digestão Anaeróbia no Mundo .....	3
2.2 Importância da Digestão Anaeróbia no Tratamento dos Resíduos Orgânicos e na Produção de Metano .....	5
2.3 Digestão Anaeróbia de Resíduos Orgânicos .....	6
2.4 Bioquímica da Metanogênese .....	8
2.5 Micro-organismos Envolvidos no Processo de Degradação Anaeróbia da Matéria Orgânica .....	10
2.5.1 Domínio <i>Bacteria</i> .....	10
2.5.2 Domínio <i>Archaea</i> .....	14
2.6 Interação Sintrófica entre Bactérias e Arqueias .....	16
2.6.1 Consumo de Hidrogênio em Reações Sintróficas .....	17
2.6.2 Energética da Transferência de H <sub>2</sub> .....	19
2.7 Fatores que Influenciam o Processo de Digestão Anaeróbia .....	19
2.7.1 Acúmulo de Ácidos Orgânicos .....	21
2.7.2 Inibição por Amônia .....	23
2.8 Importância da Comunidade Microbiana nos Sistemas de Tratamento Anaeróbio de Resíduos .....	25
2.9 Metais Essenciais: Macro e Micronutrientes .....	32
2.9.1 Funções dos Elementos Traço no Processo Biológico de Digestão Anaeróbia .....	33
2.9.2 Efeitos da Adição de Elementos Traço nos Sistemas de Tratamento Anaeróbio .....	35
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>40</b>
<b>4 PREMISSAS, HIPÓTESES E OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 PREMISSAS .....	41
4.2 HIPÓTESES .....	41
4.3 OBJETIVOS .....	42
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
5.1 Primeira Etapa – Reator Escala Demonstração .....	43
5.1.1 Tratamento de Resíduo Alimentar em Planta de metanização (pMethar) .....	43
5.1.2 Operação do Reator de Metanização pMethar .....	43
5.2 Segunda Etapa - Potencial Bioquímico de Metano (BMP) .....	44
5.2.1 Experimentos com Adição de Elementos Traço em Reatores em Batelada .....	44
5.3 Cálculo Taxa Máxima de Produção do Metano .....	48
5.4 Cálculo Potencial Bioquímico de Metano – BMP .....	49
5.5 Métodos de Caracterização da Comunidade Microbiana .....	50
5.5.1 Extração de DNA .....	50

5.5.2 Sequenciamento Massivo de Nova Geração - Metagenômica .....	51
5.5.2.1 Plataforma MiSeq/Illumina .....	502
5.5.2.2 Plataforma Ion Torrent/Thermo Fisher Scientific .....	503
<b>6 ANÁLISE METANOGÊNICA E PERFORMANCE DE REATOR ANAERÓBIO MESOFÍLICO TRATANDO RESÍDUO ALIMENTAR EM VÁRIAS TAXAS DE CARREGAMENTO .....</b>	<b>55</b>
6.1 Resumo .....	55
6.2 Abstract .....	55
6.3 Introdução .....	56
6.4 Material e Métodos .....	57
6.4.1 Operação do Reator .....	57
6.4.2 Análise de Sequenciamento MiSeq .....	58
6.5 Resultados e Discussão .....	60
6.5.1 Desempenho do Reator .....	60
6.5.2 Composição e Diversidade da Comunidade Microbiana Analisada por Sequenciamento Massivo .....	62
6.5.2.1 Composição Bacteriana .....	62
6.5.2.2 Composição das Arqueias Metanogênicas .....	68
6.5.3 Composição Microbiana das Amostras do Digestor e sua Relação com a Elevação da COV .....	69
6.6 Conclusões .....	72
<b>7 EFEITO DA ADIÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO E A COMUNIDADE MICROBIANA ENVOLVIDA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUO ALIMENTAR .....</b>	<b>73</b>
7.1 Introdução .....	73
7.2 Materiais e Métodos .....	74
7.2.1 Experimentos em Batelada com e sem adição de elementos traço .....	74
7.2.2 Produção de Metano .....	77
7.2.3 Procedimentos Analíticos .....	78
7.2.4 Análise da Comunidade Microbiana através de Sequenciamento de Nova Geração usando a Plataforma Ion Torrent .....	79
7.3 Resultados e Discussão .....	80
7.3.1 Produção Acumulada de Metano .....	80
7.3.2 Incremento de CH <sub>4</sub> .....	87
7.3.3 Composição e Diversidade da Comunidade Microbiana Determinado por Sequenciamento Massivo .....	92
7.4 Conclusões .....	109
<b>8 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>110</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>112</b>
<b>10 APÊNDICE .....</b>	<b>121</b>
<b>11 ANEXO .....</b>	<b>152</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2-1.</b> Fluxograma anaeróbia das fases de degradação da matéria orgânica .....	8
<b>Figura 2-2 (a).</b> Coenzima Metanofurano .....	9
<b>Figura 2-2 (b).</b> Coenzima Metanopterina .....	9
<b>Figura 2-2 (c).</b> Coenzima M (CoM) e (d) Coenzima F <sub>430</sub> .....	10
<b>Figura 2-3.</b> Características e atividades de bactérias oxidantes de ácidos graxos e álcool e sua reação sintrófica com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas .....	17
<b>Figura 2-4.</b> Esquema de interação entre células e metais .....	32
<b>Figura 5-1.</b> Plataforma de metanização de resíduos orgânicos (pMethar) .....	43
<b>Figura 5-2.</b> Digestor escala demonstração localizado na pMethar UFMG.....	44
<b>Figura 5-3.</b> Amostras de lodo/inóculo (a) e de substrato/resíduo alimentar (b) .....	46
<b>Figura 5-4.</b> Comparação e especificações das plataformas .....	51
<b>Figura 5-5.</b> Sequenciamento MiSeq/Illumina .....	53
<b>Figura 5-6.</b> Sequenciamento Ion Torrent/Termo Fisher Scientific .....	54
<b>Figura 6.1 -</b> O gráfico de PcoA descreve as diferenças na diversidade microbiana .....	60
<b>Figura 6-2.</b> Perfis de rendimento do metano e da TCO durante operação do reator .....	62
<b>Figura 6-3.</b> Comunidade microbiana em nível de filo. ....	63
<b>Figura 6-4.</b> Composição taxonômica de <i>Firmicutes</i> (a) e <i>Proteobacteria</i> (b) em nível de família de cada sequenciamento pelo MiSeq/ Illumina.....	64
<b>Figura 6-5.</b> Composição taxonômica de metanogênicas em nível de gênero de cada amostra coletada pelo sequenciamento MiSeq/Illumina .....	68
<b>Figura 7-1.</b> Média da produção acumulada de metano no teste com concentrações de cloreto férrico (a), cloreto de cobalto (b) e molibdato de amônio (c) .....	82
<b>Figura 7-2 -</b> Produção acumulada de metano nos testes com as combinações de elementos traço S/I 0,5 (d) e 1,5 (e) .....	86
<b>Figura 7-3.</b> Produção acumulada de metano nos testes com as combinações Mo+Fe+Ni .....	87
<b>Figura 7-4.</b> Análise das Coordenadas Principais (PCoA) da diversidade microbiana .....	94
<b>Figura 7-5.</b> Composição da comunidade microbiana em nível de filo.....	96
<b>Figura 7-6.</b> Composição da comunidade microbiana em nível de ordem .....	99
<b>Figura 7-7.</b> Composição da comunidade microbiana em nível de ordem (a) e família (b) ...	100
<b>Figura 7-8.</b> Composição taxonômica de arqueias metanogênicas em nível de família .....	103

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 2-1.</b> Bactérias atuantes na hidrólise de polímeros detectadas em digestores anaeróbios metanogênicos .....	6
<b>Quadro 2-2.</b> Principais grupos taxonômicos bacterianos envolvidos em processos de digestão anaeróbia metanogênica .....	13
<b>Quadro 2-3.</b> Principais representantes de arqueias envolvidas na metanogênese .....	14
<b>Quadro 2-4.</b> Principais bactérias oxidantes de ácidos graxos encontradas no processo de digestão anaeróbia .....	18
<b>Quadro 2-5.</b> Estudos que investigaram a comunidade microbiana de digestores anaeróbios de tratamento de resíduos orgânicos .....	27
<b>Quadro 2-6.</b> Elementos traço e suas funções nos micro-organismos .....	35
<b>Quadro 5-1.</b> Resumo dos ensaios de BMP realizados .....	45
<b>Quadro 5-2.</b> Resumo das amostras sequenciadas nas etapas 1 e 2 .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2-1.</b> Produção de biogás por meio da digestão anaeróbia de países europeus .....	4
<b>Tabela 2-2.</b> Rendimento de metano gerado a partir de resíduos orgânicos .....	6
<b>Tabela 2-3.</b> Tipos de reações dos substratos e a variação de energia livre .....	19
<b>Tabela 2-4.</b> Concentrações de elementos traços registrados em resíduos alimentares .....	36
<b>Tabela 2-5.</b> Quantidade de elementos traços requeridos/adicionados em algumas referências .....	37
<b>Tabela 2-6.</b> Estudos com adição de elementos traços para o aumento na produção de metano .....	38
<b>Tabela 5-1.</b> Soluções concentradas dos elementos traço .....	48
<b>Tabela 5-2.</b> Concentrações de elementos traço e respectivos volumes adicionados nos testes .....	48
<b>Tabela 5-3.</b> Ensaios com diferentes combinações e concentrações de metais adicionados nos reatores .....	48
<b>Tabela 5-4.</b> Comparação e especificações das plataformas .....	51
<b>Tabela 6-1.</b> Características das amostras dos inóculos (lodo de UASB e rumen bovino), resíduo alimentar e amostras das diferentes fases de operação do digestor .....	58
<b>Tabela 6-2.</b> Composição taxonômica da comunidade microbiana em nível de filo das sequências obtidas a partir das amostras do biodigestor .....	71
<b>Tabela 7-1.</b> Testes de BMP com adição de elementos traço nas diferentes condições testadas .....	76
<b>Tabela 7-2.</b> Concentração de sólidos determinada para as diferentes amostras de resíduo e lodo .....	77
<b>Tabela 7-3.</b> Concentrações de metais no resíduo alimentar e no inóculo .....	79
<b>Tabela 7-4.</b> Taxa máxima de produção de metano, % de aumento na produção de metano para os ensaios realizados e BMP .....	87
<b>Tabela 7-5.</b> Índices de diversidade e riqueza e número de OTU's identificadas em cada amostra pela análise IonTorrent .....	93
<b>Tabela 7-6.</b> Elementos traço e enzimas .....	104
<b>Tabela 7-7.</b> Abundância relativa de bactérias e arqueias nas diferentes concentrações de elementos traço .....	108
<b>Tabela 7-8.</b> Abundância relativa de metanogênicas e a produção de metano .....	108

# 1 INTRODUÇÃO

A elevada densidade populacional, juntamente com a evolução tecnológica e industrial, têm sido responsáveis pelo aumento na geração de resíduos sólidos urbanos (RSU). Em nível mundial, as cidades têm gerado cerca de 1,3 bilhão de toneladas de RSU por ano e é esperada sua duplicação até 2025 (GARDNER, 2012).

Na Europa, os municípios produzem mais de 258 milhões de toneladas de RSU por ano (YU *et al.*, 2014). Na América Latina são gerados 135 milhões de toneladas de resíduos por ano (ICLEI, 2015). No Brasil, a geração estimada de RSU é de 73,4 milhões por ano, sendo gerados *per capita* em torno de 1,2 kg por habitante ao dia (ABRELPE, 2012).

Nos países em desenvolvimento a fração orgânica dos RSU (FORSU) pode variar de 40 a 85% dos RSU gerados (LOZANO *et al.*, 2009; WORLDBANKE, 2012). No Brasil a FORSU corresponde a 51%; os materiais recicláveis tais como: vidro, papelão e alumínio correspondem a 32%; a categoria 'outros' inclui rejeitos de trapos, grampos, cliques correspondem a 17% (IBGE, 2010). O marco regulatório para gestão de RSU no Brasil foi instituído pela Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), por meio da Lei nº 12.305/2010 que estabelece desafios da gestão integrada para o gerenciamento dos RSU nos municípios.

O tratamento e a eliminação dos RSU têm sido um desafio em todo o mundo devido à sua variada composição. O processo de digestão anaeróbia tem sido utilizado para tratar o resíduo orgânico, a exemplo do resíduo alimentar constituído de proteínas, lipídios, carboidratos e gorduras; além de aproveitar os produtos gerados. Esse processo ocorre por meio de um consórcio microbiano que converte compostos complexos em moléculas menores e simples (KHALIL *et al.*, 2012).

Em nível internacional existe uma tendência para recuperação do conteúdo energético a partir de resíduos orgânicos utilizando a digestão anaeróbia. Assim, substituem os aterros sanitários com elevado risco de comprometimento de bacias hidrográficas e lençóis freáticos, além da redução na produção de gases de efeito estufa.

A digestão anaeróbia de resíduos orgânicos tem atraído forte interesse, por conter elevada biodegradabilidade e potencial de produção de metano. A tecnologia tornou-se uma alternativa com seus duplos benefícios de estabilização do material orgânico e recuperação do

conteúdo de energia (NIU *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016). Entretanto, estudos retratam que o resíduo orgânico é o principal limitante, para a operação estável em diferentes cargas orgânicas de sistemas com produção de biogás e de mistura completa, decorrente da variada composição (ZHANG *et al.*, 2017). Diante das implicações, em muitos estudos, estão incluindo como estratégia, à adição de elementos traço conhecidos como cofatores enzimáticos para micro-organismos, e conseqüentemente estabilidade do processo (BANKS *et al.*, 2012; FACCHIN *et al.*, 2013; YRONG *et al.*, 2015).

A degradação anaeróbia da matéria orgânica a dióxido de carbono e metano é realizado por micro-organismos que atuam em simbiose, entre bactérias e arqueias metanogênicas (ZEDNER *et al.*, 1982). Por isso, o estudo da comunidade microbiana é fundamental para entender e compreender, o processo de digestão anaeróbia em diferentes condições ambientais, tais como a elevada taxa de carregamento orgânico e o acúmulo de inibidores intermediários.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aplicação da Digestão Anaeróbia no Mundo

A transformação de resíduos em energia e outros produtos têm sido considerados uma prioridade social e científica em decorrência das alterações climáticas, esgotamento de combustíveis fósseis e gás natural e falta de espaço geográfico, com consequente acúmulo de resíduos (GOBERNA *et al.*, 2010; PALATSI *et al.*, 2010; BERNSTAD e JANSEN, 2011).

Os números referentes ao potencial de produção do biogás e, consequente redução dos resíduos em sistemas de digestão anaeróbia tem demonstrado serem vantajosos e competitivos no mercado europeu no campo de energia renovável (LOZANO *et al.*, 2009; BERGMANN *et al.*, 2010; GOBERNA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2014). Sob o ponto de vista tecnológico, os países europeus atingiram significativa maturidade em relação ao tratamento de resíduos sólidos, com a implantação de plantas com elevada capacidade instalada e complexidade operacional.

Até o ano de 2013, a Europa contabilizava um total de 244 plantas, com capacidade para tratar quase 8 milhões de toneladas de resíduos orgânicos, via digestão anaeróbia (DE BAERE, 2015). Os países com maior capacidade instalada são: Alemanha, com 2 milhões de toneladas por ano e Espanha, com 1,6 milhões de toneladas por ano, ajustados ao número de pessoas, com 290 k/tonelada de produção de biogás em 2012; a Holanda e a Suíça, com capacidade anual de 52.400 e 49.000 toneladas, respectivamente, por milhão de pessoas. Holanda é o país com maior produção de biogás com 297 k/tonelada (Tabela 2-1). Durante os três últimos anos, os Países Baixos têm implementado estratégias com intuito de promover a digestão anaeróbia da fração orgânica de RSU, em virtude do esgotamento dos poços de gás no Mar do Norte. A intenção é produzir grande quantidade de biometano e substituir de 15 a 20% o gás natural até 2030 (DE BAERE, 2015).

A Suécia tem sido um exemplo, pelo fato de aterrar cerca de apenas 1% dos resíduos gerados. A participação da população é fundamental para o sucesso do programa. As empresas (fabricantes) são responsáveis pela coleta domiciliar, destinação e segregação dos resíduos. A segregação ocorre nos domicílios em duas frações: utilizam-se saco preto para o material orgânico, que são transportados para sistemas de digestão anaeróbia; e sacos branco para o material seco, tais como os plásticos, vidros, metais, papéis, nos quais são transportados para a incineração (NETTO, 2014).

**Tabela 2-1.** Produção de biogás por meio da digestão anaeróbia de países europeus

Localidade	Produção de Biogás em k/tonelada		
	2008	2010	2012
Alemanha	3,05	4,235	6,416
Itália	410	507	1,178
Espanha	206	277	290
Holanda	225	293	297
Suécia	102	111	126
Dinamarca	93	104	104

Fonte: Eubia (2016).

A usina de biogás na cidade de Sobacken processa em digestores anaeróbios, somente a fração orgânica biodegradável dos resíduos domiciliares e industriais, gerando o biogás. Este biogás é utilizado como combustível veicular e o composto orgânico gerado substitui o fertilizante químico nas plantações rurais. Outro exemplo Sueco é no município de Boras, com aproximadamente 100 mil habitantes, no qual a digestão anaeróbia também foi adotada. Neste, todos os caminhões de coleta de ‘lixo’ e os veículos de transporte público são movidos pelo biogás produzido, que contém originalmente cerca de 60 a 70% de metano. Alternativamente, o biogás pode ser empregado também para a geração de energia elétrica, utilizando-se um motor estacionário (NETTO, 2014).

De acordo com a Agência Internacional de Energia (“International Energy Agency”-IEA), até o ano de 2012 não houve instalação de sistemas de digestão anaeróbia para o aproveitamento de energia e outros produtos, a partir de resíduos urbanos na América Latina, incluindo o Brasil. No Brasil, acredita-se que a planta de metanização (pMethar), instalada no campus da UFMG, seja o primeiro digestor anaeróbio para tratamento de resíduo alimentar. A capacidade é para tratar de 500 a 800 kg/dia de resíduo alimentar, com produção de 55 a 70% de metano (CH<sub>4</sub>). Atualmente no Brasil, encontra-se em fase final de construção a primeira planta industrial para a metanização da fração orgânica de RSU utilizando a tecnologia de túneis de metanização de bateladas sequenciais (TMBS). O projeto tem sido desenvolvido pela UFMG em parceria com a empresa Methanum Resíduo e Energia e a Companhia Municipal de Limpeza Urbana (COMLURB) no Rio de Janeiro, com financiamento do BNDES. Trata-se de uma planta piloto com capacidade inicial para tratar 25 toneladas/dia de RSU gerados no município do Rio de Janeiro. Os resultados deverão possibilitar no escalonamento da planta para pequenos, médios e grandes municípios brasileiros. Serão recolhidos pela COMLURB cerca de 8.800 toneladas por

dia de resíduo, representando potencial de geração de 500 a 800 kg de composto orgânico por tonelada de resíduo tratado (Methanum).

## ***2.2 Importância da Digestão Anaeróbia no Tratamento dos Resíduos Orgânicos e na Produção de Metano***

O resíduo orgânico tem sido utilizado como fonte alternativa na produção de biogás para geração de energia e calor, decorrente da rápida biodegradabilidade e por conter fração volátil de 90% de sólidos totais (KIM *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014). Este possui menos poluentes quando comparado aos combustíveis fósseis, tais como petróleo, carvão mineral e o gás natural (NAGÃO *et al.*, 2012; FORSTER-CARNEIRO *et al.*, 2017). Para o resíduo alimentar foi registrado uma DQO da ordem de 152 a 328g/L, sendo essencial o tratamento como medida profilática na formação do chorume no ambiente (NAGÃO *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2013).

O biogás formado a partir da biodegradabilidade de resíduo é geralmente composto por 48 a 65% de metano (CH<sub>4</sub>), 36 a 41% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 17% de nitrogênio, < 1% de oxigênio, 32 a 169 ppm de sulfeto de hidrogênio e vestígios de gases. O CH<sub>4</sub> um dos principais gases de efeito estufa (GEE) com potencial contribuição para o aquecimento global é 28 vezes superior ao gás carbônico (IPCC, 2007; LIU e WHITMAN, 2008). Entretanto, o metano (CH<sub>4</sub>) pode ser reaproveitado e reutilizado como fonte de energia ou comercializado por meio de linhas de crédito de carbono, diminuindo a emissão no meio ambiente. Se o metano não for aproveitado, o produto deve ser queimado para redução do CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub> antes de ser liberado para a atmosfera.

A produção e o rendimento de metano podem ser usados para avaliar o processo de digestão anaeróbia da fração orgânica (DE BAERE, 2015). Pesquisas mostram diferenças substanciais observadas no rendimento de metano, com relação à cinética de diferentes tipologias de resíduo orgânico tratado, conforme sumarizados na tabela 2-2.

**Tabela 2-2.** Rendimento de metano gerado a partir de resíduos orgânicos

Substrato	Rendimento de metano	Unidade/SV	Referências
Resíduos de frutas e vegetais	420	L/kg	Bouallagui <i>et al.</i> (2005)
Resíduo orgânico	530	L/kg	Forster-Carneiro <i>et al.</i> (2007)
Resíduo alimentar	294	L/kg	Behera <i>et al.</i> (2010)
Resíduo alimentar	396	L/kg	Zhang <i>et al.</i> (2011)
Resíduo alimentar	413	mL/kg	Lisboa <i>et al.</i> (2013)
Resíduo Alimentar	370 a 700	mL/kg	Yi <i>et al.</i> (2014)
Resíduo orgânico	275 a 348	mL/kg	Ortner <i>et al.</i> (2015)
Resíduo alimentar	480	mL/kg	Zamanzadeh <i>et al.</i> (2016)

### 2.3 Digestão Anaeróbia de Resíduos Orgânicos

A digestão anaeróbia é um complexo processo de mineralização e bioestabilização da matéria orgânica, que envolve diversos grupos de micro-organismos com recíproca interação por trocas de substratos, e cada grupo com capacidades fisiológicas distintas (ANGELIDAKI, *et al.*, 2002; ANGENENT *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2005; CHERNICHARO, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008; LOZANO *et al.*, 2009; BERGMANN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011). O processo de degradação da matéria orgânica ocorre em cinco fases:

1. hidrólise: bactérias fermentativas hidrolíticas convertem, por meio da ação de exoenzimas, materiais complexos como polímeros (proteínas, lipídios, carboidratos) em compostos solúveis simples, em monômeros. As proteínas são convertidas em aminoácidos, lipídios solúveis em ácidos graxos voláteis e os carboidratos em açúcares simples (Figura 2-1). Nesta fase, qualquer alteração do meio (pH, temperatura) pode inviabilizar a velocidade do processo e interromper a atividade dos micro-organismos envolvidos. Autores têm sugerido micro-organismos específicos para cada tipo de substrato, conforme explicitado no quadro 2-1.

**Quadro 2-1.** Bactérias atuantes na hidrólise de polímeros detectadas em digestores anaeróbios metanogênicos

Micro-organismos	Substrato	Gênero
Hidrolíticos	Celulose	<i>Clostridium</i> , <i>Petrotoga</i>
	Hemicelulose	<i>Clostridium</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Thermomonospora</i>
	Proteínas	<i>Proteiniphilum</i> , <i>Petrimonas</i> , <i>Paludibacter</i> , <i>Tepidimicrobium</i> , <i>Anaerobaculum</i> , <i>Coprothermobacter Proteolyticus</i>
	Lipídios	<i>Anaerovibrio</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Propionibacterium</i>

Fonte: Del Rio *et al.* (2014)

2. acidogênese: bactérias acidogênicas assimilam, metabolizam e convertem os compostos gerados na hidrólise, principalmente, os ácidos graxos voláteis (AGV's) como, propionato, acetato e butirato; e em menores quantidades são gerados álcoois, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, amônia, sulfeto, dióxido de carbono e novas células bacterianas.

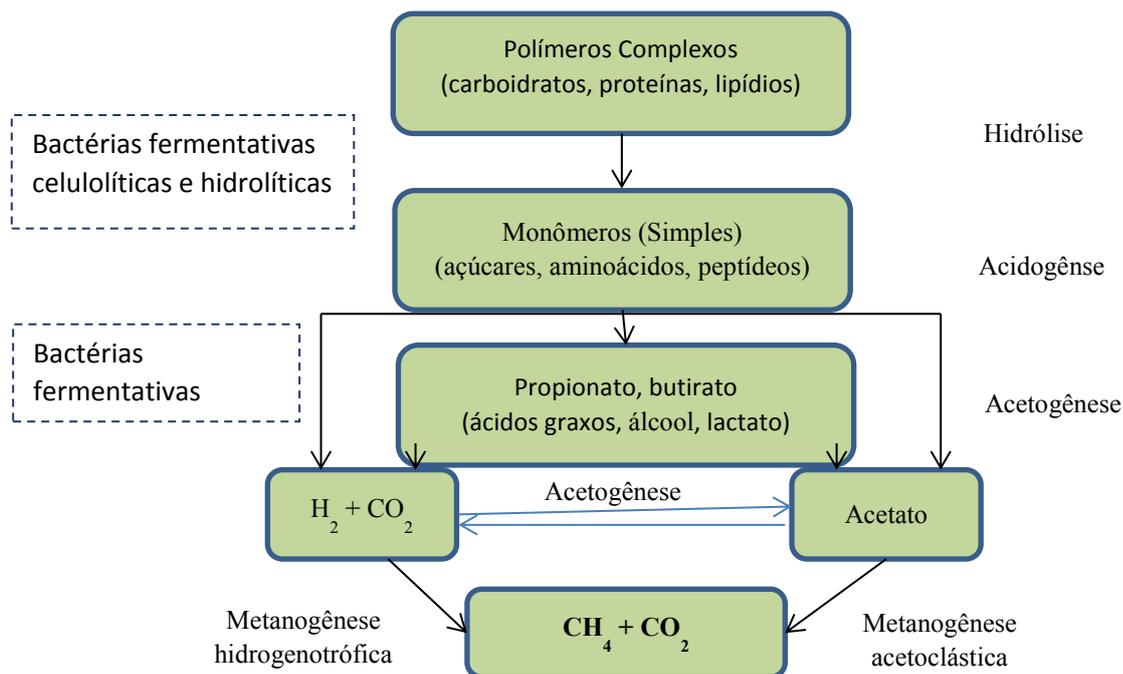
3. acetogênese: bactérias acetogênicas convertem os produtos gerados na acidogênese, principalmente, os ácidos orgânicos propionato e butirato, convertidos em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio. Sabe-se que a formação de acetato resulta na produção de grande quantidade de  $H_2$  a partir dos ácidos orgânicos.

4. metanogênese: as arqueias metanogênicas convertem os compostos orgânicos gerados na acetogênese em biogás, principalmente metano ( $CH_4$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). O metano é produzido pelas arqueias, por duas vias metabólicas principais: (a) arqueias hidrogenototróficas, utilizam o hidrogênio ( $H_2$ ) como doador de elétrons e o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) como acceptor de elétrons para a produção de metano ( $CH_4$ ); (b) arqueias acetoclásticas: transformam o acetato em metano ( $CH_4$ ) e em dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Em digestores anaeróbios, cerca de 70% do metano produzido advém da degradação do acetato durante o metabolismo das metanogênicas acetoclásticas (AQUINO *et al.*, 2007).

As arqueias também são conhecidas devido à sua capacidade e necessidade de interagir com bactérias acetogênicas por meio da específica relação metabólica sintrófica. Por exemplo, a degradação do butirato e do acetato pelas bactérias acetogênicas é possível porque as arqueias metanogênicas mantêm uma redução na pressão parcial de  $H_2$  por meio do consumo. Esta relação sintrófica permite que ocorra a acetogênese e a metanogênese.

5. sulfetogênese: as bactérias reduzem os sulfatos e outros compostos sulfurados em sulfetos. Este grupo de micro-organismos utiliza diversos substratos orgânicos como doadores de elétrons, podendo competir com as demais bactérias e arqueias. Esta fase pode ocorrer ou não, dependerá da disponibilidade de sulfato no meio. Neste caso, a produção de metano tende a diminuir e a de gás sulfídrico aumentar, tornando indesejável do ponto de vista do balanço energético e do aproveitamento do biogás.

## Degradação anaeróbia da Matéria Orgânica



Fonte: Angelidaki *et al.* (2002); Madigan *et al.* (2010).

**Figura 2-1.** Fluxograma anaeróbia das fases de degradação da matéria orgânica

### 2.4 Bioquímica da Metanogênese

A produção de metano é realizada pelo grupo de arqueias anaeróbias estritas, denominadas metanogênicas. A produção do metano ocorre de forma biológica por meio de uma série de reações envolvendo uma complexidade de coenzimas. As coenzimas-chave na metanogênese podem ser agrupadas em duas classes: aquelas envolvidas no transporte da unidade carreador C<sub>1</sub> do substrato inicial, CO<sub>2</sub>, ao produto final, CH<sub>4</sub>; e aquelas que participam de reação redox, fornecendo os elétrons necessários à redução de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>.

A coenzima **metanofurano** participa da primeira etapa da metanogênese. O metanofurano contém um anel furano de cinco membros e um átomo de nitrogênio na forma amino, que se liga ao CO<sub>2</sub> (Figura 2-2 (a)).



## ***2.5 Micro-organismos Envolvidos no Processo de Degradação Anaeróbia da Matéria Orgânica***

### ***2.5.1 Domínio Bacteria***

A partir da análise comparativa de sequências de genes do RNAr 16S (RNA ribossômico), linhagens celulares, distintas filogeneticamente foram classificadas em três domínios, *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (eucariotos).

O Domínio Bacteria é representado por um grupo diversificado de bactérias, que são diferenciados pela morfologia (tamanho e forma), fisiologia, mecanismos de divisão celular, patogenicidade, adaptação aos extremos ambientais, à filogenia entre outros (MADIGAN *et al.*, 2010). O gene RNAr 16S é utilizado em estudos de filogenia como marcador molecular, classificando as bactérias em mais de oitenta filos, dentre os principais destacam-se:

*Actinobactéria:* são bactérias gram-positivas de alto índice de G + C. Muitas dessas bactérias são altamente polimórficas. Os gêneros *Corynebacterium* e *Gardnerella*, por exemplo, e diversos gêneros, como o *Streptomyces*, desenvolvem-se somente com filamentos estendidos e ramificados. Os gêneros patogênicos importantes encontrados entre as *Actinobacteria*, como as espécies de *Mycobacterium* causadora de tuberculose e lepra. Embora esse gênero seja normalmente visto microscopicamente como bacilo típico em forma de bastão, seu nome é derivado do fato de ocasionalmente se observarem crescimentos como filamentos parecidos com fungos. Alguns actinomicetos assemelham-se mais aos fungos, pois possuem esporos assexuados carregados externamente e que são usados para reprodução.

*Bacterioidetes:* bactérias do gênero *Bacteroides* vivem no trato intestinal humano, atingindo números próximos a 1 bilhão por grama de fezes. Esses micro-organismos são móveis e não formadores de esporos, proteolíticos e metabolizam aminoácidos para produzir ácidos, como acetato, propionato e succinato (RIVIÈRE *et al.*, 2009).

*Chlamydiae:* os membros deste filo são agrupados com outras bactérias geneticamente semelhantes e que não contêm peptidoglicana em sua parede celular. *Chlamydia* possuem um ciclo único de desenvolvimento, característica diferenciada. São bactérias do tipo cocoide gram-negativas.

*Chlorobi e Chloroflexi:* são bactéria fotossintéticas verdes sulfurosas (*Chlorobi*) e não sulfurosas (*Chloroflexi*), anoxigênicas, gram-negativas. Essas bactérias realizam a fotossíntese

para a produção de carboidratos ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). A fotossíntese realizada por esses microorganismos, diferente da forma que ocorre pelas plantas, não produz oxigênio. As plantas, as algas e as cianobactérias produzem oxigênio ( $\text{O}_2$ ) a partir da água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) enquanto realizam a fotossíntese. As bactérias verdes sulfurosas utilizam compostos reduzidos de enxofre, como o sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), ao invés de água, e produzem grânulos de enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ) ao invés de oxigênio.

Firmicutes: essas bactérias são gram-positivas de baixo índice de G + C; incluem bactérias formadoras de endósporos importantes, como os gêneros *Clostridium* e *Bacillus*. Os gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* também são de extrema importância na microbiologia médica. Na microbiologia industrial, é conhecido o gênero *Lactobacillus*, que produz o ácido láctico. Essas bactérias são acetogênicas e sintróficas, atuam na degradação de ácidos orgânicos, principalmente, o butirato.

Fusobactéria: são bactérias anaeróbias do tipo fusiforme, pleomórficas, podem ter a forma de fuso. Os membros do gênero *Fusobacterium* são compridos e delgados, com as extremidades afiladas, ao invés de arredondadas. Em humanos, podem ser encontradas na fenda gengival ocasionando abscessos dentários.

Proteobactéria, alphaproteobactéria: incluem a maioria das proteobactérias que são capazes de crescer com níveis de nutrientes baixos. Algumas possuem morfologia incomum, incluindo protuberâncias como pedúnculos ou brotos conhecidos como prostecas. Também estão incluídas bactérias agrícolas importantes capazes de induzir a fixação de nitrogênio na simbiose com plantas, além dos patógenos de plantas e humanos.

Proteobactéria, betaproteobactéria: frequentemente utilizam nutrientes que se difundem das áreas de decomposição anaeróbia da matéria orgânica, como o gás hidrogênio, amônia e metano. Diversas bactérias patogênicas importantes são encontradas nesse grupo.

Proteobactéria, gamaproteobactéria: Constituem o maior subgrupo das proteobactérias e incluem uma variedade de tipos fisiológicos.

Proteobactéria, deltaproteobactéria: são distintas, pois incluem bactérias que são predadoras de outras. Os membros desse grupo são importantes contribuintes no ciclo do enxofre.

Proteobactéria epsilonproteobactéria: são bastonetes gram-negativos delgados que tem forma helicoidal ou vibrióide. Vibrióide é um termo usado para bactérias helicoidais que não têm uma torção completa.

Spirochaetes: essas bactérias são morfologicamente espiraladas, como um espiral metálico, algumas mais compactas que as outras. A característica peculiar desse grupo é o seu método de motilidade, que faz uso de dois ou mais filamentos axiais (ou endoflagelos), encerrados com espaço entre a bainha externa e o corpo da célula. Uma extremidade de cada filamento axial está fixada próxima a um dos polos da célula. Pela rotação do seu filamento axial, a célula faz a rotação na direção oposta, como um saca-rolha, eficiente para mover organismos em ambientes líquidos. No quadro 2-2 estão expostos os principais grupos de bactérias registrados em sistemas anaeróbios.

**Quadro 2-2.** Principais grupos taxonômicos bacterianos envolvidos em processos de digestão anaeróbia metanogênica

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	
<i>Actinobacteria (Gram +)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>	
			<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Brooklawnia,</i> <i>Propionibacterium</i>	
			<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Thermomonospora</i>	
<i>Bacteroidetes (Gram -)</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Olsenella</i>	
		<i>Bacteriodales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Paludibacter, Petrimonas,</i> <i>Proteiniphilum</i>	
				<i>Prolixibacter</i>	
<i>Proteobacteria (Gram -)</i>	<i>Alfaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i>	
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Ralstonia</i>	
	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophaceae</i>	<i>Smithella, Syntrophus</i>	
			<i>Syntrophobacteraceae</i>	<i>Syntrophobacter</i>	
			<i>Gamaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Shewanellaceae</i>
<i>Spirochaetes (Gram -)</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i>	
<i>Synergistetes (Gram -)</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>	<i>Anaerobaculum</i>	
<i>Thermotogae (Gram +)</i>	<i>Thermotogae</i>	<i>Thermotogales</i>	<i>Thermotogaceae</i>	<i>Petrotoga</i>	
<i>Fibrobacteres (Gram -)</i>	<i>Fibrobacteria</i>	<i>Fibrobacteriales</i>	<i>Fibrobacteraceae</i>	<i>Fibrobacter</i>	
<i>Firmicutes (Gram +)</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	
		<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium, Tepidimicrobium</i>
	<i>Eubacteriaceae</i>			<i>Acetobacterium, Eubacterium</i>	
	<i>Lachnospiraceae</i>			<i>Butyrivibrio</i>	
	<i>Peptococcaceae</i>			<i>Pelotomaculum</i>	
	<i>Ruminococcaceae</i>			<i>Ruminococcus</i>	
	<i>Syntrophomonadaceae</i>			<i>Syntrophomonas,</i> <i>Thermosyntropha</i> <i>Symbiobacterium</i>	
	<i>Thermoanaerobacterales</i>			<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	<i>Moorella, Tepidanaerobacter,</i> <i>Thermacetogenium,</i> <i>Thermoanaerobacter</i>
	<i>Thermodesulfobiaceae</i>			<i>Coprothermobacter</i>	
			<i>Syntrophaceticus</i>		
<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Anaerovibrio, Sporomusa</i>		

Disponível em: <http://www.bacterio.net/-classifphyla.html#bacteria>. Acesso em: 15 de outubro de 2016

## 2.5.2 Domínio *Archaea*

O Domínio *Archaea* está inserido no grupo *Euryarchaeota*, foram os primeiros identificados a partir de análises filogenética de genes RNAr 16S. O grupo apresenta espécies de microorganismos com diferentes formas celulares e filogenia distinta dos procariontes típicos (RASKIN *et al.*, 1995; VAZOLLER *et al.*, 1999). Os principais representantes de arqueias metanogênicas envolvidas em sistemas anaeróbios estão expostos no quadro 2-3.

**Quadro 2-3.** Principais representantes de arqueias envolvidas na metanogênese

Classe	Ordem	Família	Gênero		
<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>		<i>Methanobacterium</i>		
		<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanosphaera</i>		
		<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanothermobacter</i>		
<i>Methanococci</i> <i>Methanothermea</i>	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i> <i>Methanotorris</i>		
		<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i> <i>Methanothermococcus</i>		
<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanocellales</i>	<i>Methanocellaceae</i>	<i>Methanocella</i>		
	<i>Methanomicrobiales</i>		<i>Methanocorpusculum</i> <i>Methanoculleus</i> <i>Methanofollis</i>		
		<i>Methanocorpusculaceae</i>	<i>Methanogenium</i> <i>Methanolacinia</i> <i>Methanomicrobium</i> <i>Methanoplanus</i>		
		<i>Methanoregulaceae</i>	<i>Methanolinea</i> <i>Methanoregula</i> <i>Methanosphaerula</i>		
		<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>		
		Não classificados	<i>Methanocalculus</i>		
		<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaetaceae</i> (*)	<i>Methanosaeta</i> <i>Methanotherix</i> <i>Halomethanococcus</i> <i>Methanimicrococcus</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanolobium</i>	
			<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanolophilus</i> <i>Methanolobus</i> <i>Methanomethylororans</i> <i>Methanosalsum</i> <i>Methanosarcina</i>	
			<i>Methermicoccaceae</i>	<i>Methermicoccus</i>	
			Não classificados	-	<i>Methanomassillicoccus</i>
		<i>Methanopyri</i>	<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>

Fonte: Del Rios *et al.* (2014)

As arqueias metanogênicas são micro-organismos com metabolismo quimiorganotrófico ou autotrófico, anaeróbios obrigatórios e altamente redutoras, existindo em ambientes com potencial reduzido de oxido-redução na ordem de -300 mV. Desenvolvem-se bem em ambientes com pH entre 6,8 e 7,5 (APPELS *et al.*, 2008). Apesar de requerem condições fastidiosas para o crescimento, estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em diversos ambientes, tais como: sedimentos aquáticos, pântanos, gêisers, trato digestivo de ruminantes e de animais endotérmicos, digestores anaeróbios de tratamento de resíduos, aterros sanitários e efluentes (VAZOLLER *et al.*, 1999).

As características mais evidentes das arqueias, estão relacionadas com a especificidade por substratos para crescimento e produção de metano. Possuem coenzimas e cofatores específicos, que degradam apenas um número limitado de substratos com baixo número de carbonos. Estes incluem os substratos do tipo CO<sub>2</sub>, metil e, principalmente, acetato (VAZOLLER *et al.*, 1999; MADIGAN *et al.*, 2010).

(i). Os substratos do tipo CO<sub>2</sub> incluem naturalmente, o próprio dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o qual é reduzido a metano (CH<sub>4</sub>) utilizando o H<sub>2</sub> como doador de elétrons. Outros substratos incluem formiato que corresponde a CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> na forma orgânica; e monóxido de carbono (CO).

(ii). Os substratos do tipo metilados utilizam o metanol (CH<sub>3</sub>OH) modelo contendo metil. A formação de metano (CH<sub>4</sub>) pode ocorrer de duas formas: (1) via hidrogenotrófica na qual o metanol (CH<sub>3</sub>OH) pode ser reduzido utilizando um doador de elétrons externo, como o hidrogênio (H<sub>2</sub>); (2) na ausência de H<sub>2</sub>, parte do CH<sub>3</sub>OH pode ser oxidado a CO<sub>2</sub>, produzindo elétrons necessários à redução de outras moléculas de CH<sub>3</sub>OH a CH<sub>4</sub>.

(iii). O final do processo metanogênico corresponde à clivagem de acetato em CO<sub>2</sub> mais CH<sub>4</sub>, via acetotrófica.

Esses micro-organismos têm grande importância em digestores anaeróbios. É de conhecimento que cerca de 70% do metano produzido nestes sistemas é resultante da degradação de acetato. As metanogênicas são conhecidas por contribuírem com a capacidade metabólica de bactérias através da interação microbiana (YU *et al.*, 2005; CHERNICHARO, 2007). *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta* são comumente registradas em digestores anaeróbios (JANSSEN e KIRS, 2008).

## 2.6 Interação Sintrófica entre Bactérias e Archeias

A sintrofia é uma situação nutricional na qual dois ou mais organismos combinam suas capacidades metabólicas para degradar um substrato, que não poderia ser degradado por nenhum dos dois organismos de forma individual. Por isso, são chamados de sintróficos obrigatórios. Exemplo: *Syntrophomonas wolfei* degradam butirato; *Syntrophobacter fumaroxidans* e *Pelotomaculum termopropionicum* degradam propionato (MUYZER e STAMS, 2008).

Em ambientes de água doce, que apresentam baixas concentrações de sulfato, bactérias redutoras de sulfato (BRS) têm importante papel na fermentação e na oxidação anaeróbia de compostos orgânicos. Muitas espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium* crescem por fermentação do piruvato para formar acetato, dióxido de carbono e hidrogênio como produtos. Elas também são capazes de oxidar lactato e etanol em acetato, mas somente quando o hidrogênio é eficientemente removido por metanogênicas que consomem o hidrogênio. Esse crescimento de redutoras de sulfato com metanogênicas foi demonstrado pela primeira vez por Bryant e colaboradores (BRYANT *et al.*, 1977). Além disso, os redutores de sulfato eram a bactéria acetogênica dominante em um reator metanogênico usado para tratar soro de leite (CHARTRAIN e ZEIKUS, 1986).

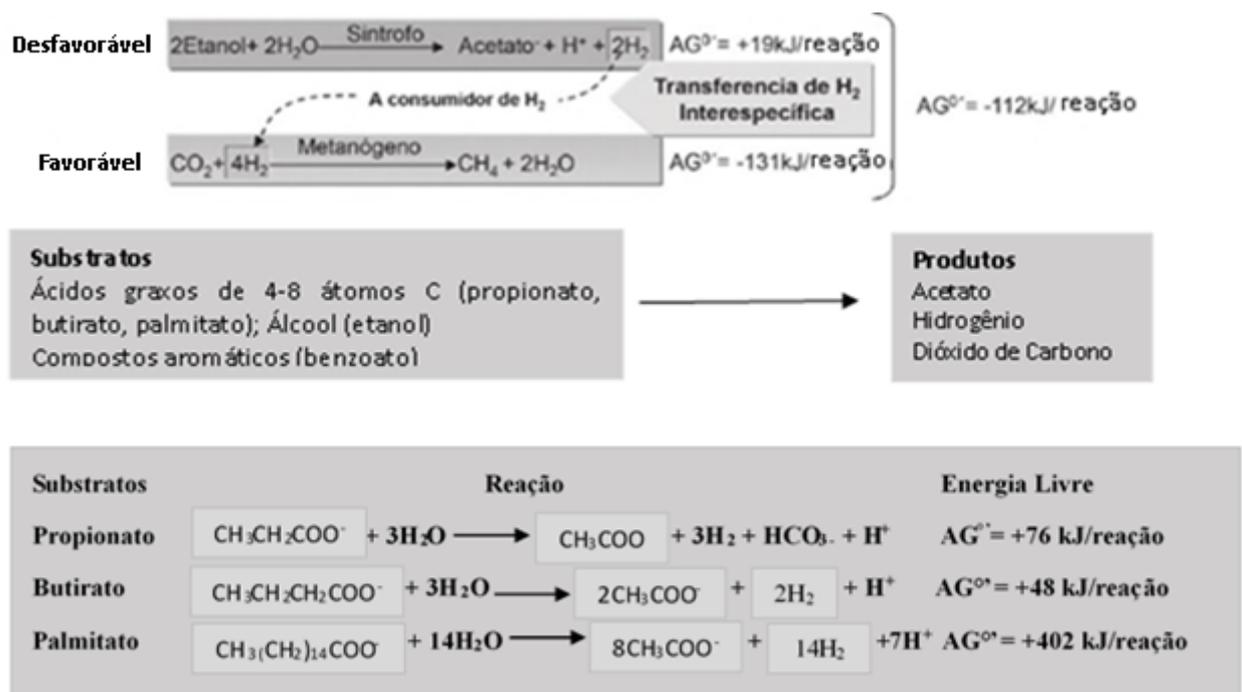
A maioria das reações sintróficas ocorre em fermentações secundárias. A sintrofia é uma chave para o catabolismo anóxico que leva a produção de metano. O metabolismo consiste de vias degradativas, catabólicas e biossintetizantes e, anabólicas. O catabolismo é a fase degradativa do metabolismo, nela as moléculas orgânicas, carboidratos, lipídios e proteínas provenientes do meio ambiente ou dos reservatórios de nutrientes da própria célula são degradados por reações consecutivas em produtos finais menores e mais simples, como por exemplo, ácido láctico, CO<sub>2</sub> e amônia. O catabolismo é acompanhado pela liberação da energia livre inerente à estrutura complexa das grandes moléculas orgânicas. Em certos passos de uma dada via catabólica a maior parte de energia livre é conservada na forma da molécula transportadora através do acoplamento de reações enzimáticas (NELSON e COX, 2011).

O anabolismo é também chamado de biossíntese, fase sintetizante ou construtiva do metabolismo. Nele, as pequenas moléculas precursoras, ou unidades fundamentais, são reunidas para formar as macromoléculas componentes das células, como as proteínas e os ácidos nucleicos. A biossíntese resulta em tamanho e complexidade de estrutura aumentada, requerendo o fornecimento de energia livre, pela quebra de trifosfato de adenosina (ATP) em

adenosina de difosfato (ADP) e fosfato. A biossíntese de alguns componentes celulares também requer átomos de hidrogênio ricos em energia, fornecidos pela nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), coenzima utilizada como receptor de elétrons nas reações das vias das pentoses-fosfato. O catabolismo e o anabolismo ocorrem simultaneamente nas células e a velocidade de cada um é regulada independentemente (NELSON e COX, 2011).

### 2.6.1 Consumo de Hidrogênio em Reações Sintróficas

O aspecto central da maioria das reações sintróficas envolve a produção de H<sub>2</sub> por um dos membros, associada ao consumo de H<sub>2</sub> pelo outro. O consumidor de H<sub>2</sub> pode ser qualquer um de vários organismos filogeneticamente distintos: bactérias desnitrificantes, redutoras de ferro férrico (ferro III/Fe<sup>3+</sup>), redutoras de sulfato, acetogênicas, metanogênicas ou mesmo fototróficas anoxigênicas (exemplo, bactérias verdes e púrpuras). Esses tipos de reações sintróficas receberam a denominação de transferência de H<sub>2</sub> interespecífica para destacar o fato do metabolismo de H<sub>2</sub> ser a chave de todo o processo (Figura 2-3).

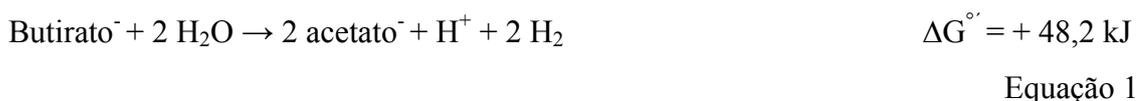


Fonte: Del Rio *et al.*, 2014

**Figura 2-3.** Características e atividades de bactérias oxidantes de ácidos graxos e álcool e sua reação sintrófica com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas

As bactérias oxidantes de ácidos graxos, produtoras de H<sub>2</sub> e fermentadores secundários possuem uma atividade chave na biometanização, metabolismo fermentativo (β oxidação), sintrofos obrigatórios (*Syntrophomonas* e *Syntrophobacter*), anaeróbios estritos de crescimento muito lento (Quadro 2-4).

Considerando a sintrofia envolvendo a fermentação de etanol em acetato, com a eventual produção de metano, o organismo fermentador de etanol realiza uma reação que apresenta uma variação de energia livre padrão ( $\Delta G^{\circ}$ ) desfavorável, isto é, positiva. Contudo, o  $H_2$  produzido pelo fermentador de etanol pode ser utilizado como um doador de elétrons para um organismo metanogênico, na metanogênese. Quando as duas reações são somadas, a reação global é exergônica (Figura 2-3) e fornece a energia necessária ao crescimento de ambos os membros da mistura sintrófica. Outro exemplo de sintrofia é a oxidação de butirato a acetato e  $H_2$ , pelo organismo sintrófico oxidante de ácido graxo, *Syntrophomonas* (Equação 1).



A variação de energia livre dessa reação é altamente desfavorável e, quando em cultura pura, *Syntrophomonas* é incapaz de crescer a partir de butirato. No entanto, se o  $H_2$  consumido por um organismo parceiro, *Syntrophomonas* passa a crescer a partir do butirato, quando em uma cocultura (técnicas de cultivo) com o consumidor de  $H_2$ .

**Quadro 2-4.** Principais bactérias oxidantes de ácidos graxos encontradas no processo de digestão anaeróbia

Substrato	Filo – Classe - Família	Espécies
<b>Ácidos graxos de cadeia longa</b>	<i>Firmicutes, Clostridia, Syntrophomonadaceae</i>	<i>Syntrophomonas sapovorans, S. saponavida, S. curvata, S. zehnderi, S. palmitatica, Thermosyntropho lipolytica</i>
	<i>Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Syntrophaceae</i>	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>
<b>Butirato</b>	<i>Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Syntrophobacteraceae</i>	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>
<b>Propionato</b>	<i>Firmicutes, Clostridia, Peptococcaceae</i>	<i>Pelotomaculum thermopropionicum, P. schinkii</i>
	<i>Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Syntrophaceae</i>	<i>Smithella propionica</i>
<b>Lactato</b>	<i>Firmicutes, Thermoanaerobacteraceae, Clostridia,</i>	<i>Tepidanaerobacter</i>
<b>Acético</b>	<i>Firmicutes, Clostridia, Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium ultunense</i>
	<i>Firmicutes, Thermoanaerobacteraceae, Clostridia,</i>	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans, Thermacetogenium phaeum</i>
	<i>Firmicutes, Clostridia (Ordem Thermoanaerobacterales)</i>	<i>Syntrophaceticus schinkii</i>

Fonte adaptada: Amani *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2013.

## 2.6.2 Energética da Transferência de H<sub>2</sub>

Na relação sintrófica, a remoção de H<sub>2</sub> por um organismo parceira afeta a energética da reação. Deve ser levado em consideração, os cálculos da energética dos baixos níveis de H<sub>2</sub> consumido. Por se tratar de um potente doador de elétrons na respiração anaeróbia, o H<sub>2</sub> é rapidamente consumido em habitats anóxicos. Esse processo permite que o H<sub>2</sub> seja mantido abaixo de 10<sup>-4</sup> atm.

Por conveniência, o ΔG<sup>o'</sup> de uma reação é calculado com base na condição padrão de produtos e reagentes na concentração de 1 molar. Ao contrário, o termo relacionado ΔG é utilizado para calcular as variações de energia livre com base nas concentrações reais de produtos e reagentes presentes. Em concentrações muito baixas de H<sub>2</sub>, uma reação endergônica na condição padrão, torna-se exergônica. Por exemplo, se a concentração de H<sub>2</sub> for mantida extremamente baixa por meio das atividades do organismo parceiro consumidor, o ΔG da oxidação do butirato por *Syntrophomonas* gera cerca de -18 kJ/mol (Tabela 2-3).

**Tabela 2-3.** Tipos de reações dos substratos e a variação de energia livre

Tipo de Reação	Reação	Troca de energia livre (kJ/reação) ΔG <sup>o'a</sup>
Fermentação de glicose a acetato, H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub>	Glicose + 4H <sub>2</sub> O → acetato <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4H <sup>+</sup> + 4H <sub>2</sub>	-207
Fermentação de glicose a butirato, CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub>	Glicose + 2H <sub>2</sub> O → butirato <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> + 3H <sup>+</sup>	-135
Fermentação de butirato a acetato e H <sub>2</sub>	Butirato <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> O → 2 acetato <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	+48,2
Fermentação de propionato a acetato, CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub>	Propionato <sup>-</sup> + 3H <sub>2</sub> O → acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	+76,2
Fermentação de etanol a acetato e H <sub>2</sub>	2 etanol + 2H <sub>2</sub> O → 2 acetato <sup>-</sup> + 4H <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup>	+19,4
Fermentação de benzoato a acetato, CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub>	Benzoato <sup>-</sup> + 7H <sub>2</sub> O → 3 acetato <sup>-</sup> + 3H <sup>+</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3H <sub>2</sub>	+70,1
Metanogênese a partir de H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	4H <sub>2</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> → CH <sub>4</sub> + 3H <sub>2</sub> O	-136
Metanogênese a partir de acetato	Acetato <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O → CH <sub>4</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-31
Acetogênese a partir de H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	4H <sub>2</sub> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> → acetato <sup>-</sup> + 4H <sub>2</sub> O	-105

CNTP: solutos, 1 M; gases, 1 atm, 25°C. Adaptados de Zinder, S. 1984.

## 2.7 Fatores que Influenciam o Processo de Digestão Anaeróbia

O sucesso da digestão anaeróbia nos digestores está relacionado a fatores ambientais e operacionais, tais como: tipo de resíduo a ser tratado, temperatura, concentração de ácidos graxos voláteis (AGV's), pH, alcalinidade, nível de amônia, origem e quantidade do inóculo (micro-organismos), tempo de detenção hidráulica, tempo de retenção dos resíduos, taxa de

carregamento orgânico ( $\text{gSV/d}^{-1}$ ), rendimento de metano ( $\text{mLSVg}^{-1}$ ) e redução de sólidos voláteis (SV %) (ANGELIDAKI e AHRING, 1994; AHRING *et al.*, 1995).

Os micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia diferem amplamente com relação à velocidade de crescimento, e a taxa de utilização de substratos. As arqueias crescem lentamente e são consideradas sensíveis a mudanças ambientais, quando comparadas as bactérias acidogênicas. Para produção de metano, as arqueias exigem pH ótimo entre 6,8 e 7,2. Valores menores que esses propiciam no desenvolvimento de bactérias acidogênicas, produtoras de ácidos e conseqüentemente, acúmulo no sistema (AHRING *et al.*, 1995).

O tratamento anaeróbio do resíduo depende do objetivo e do tipo de resíduo. Podem ser aplicados nas temperaturas mesofílica, que varia de 30 a 40°C, ou termofílica podendo variar de 50 a 55 °C. Digestores mesofílicos são mais estáveis e requerem menor gasto energético para o aquecimento (GALLERT e WINTER, 1997). Geralmente, são menos afetados por efeitos inibitórios de amônia durante a mineralização de proteínas (ANGELIDAKI e AHRING, 1994; HANSEN *et al.*, 1998) e por ácidos voláteis de cadeia longa (FIELDS, 2001). Digestores termofílicos permitem menor tempo de retenção, além de oferecer maior eficiência na degradação da matéria orgânica quando comparados aos digestores com temperatura mesofílica (SANCHES *et al.*, 2000; ZÁBRANSKÁ *et al.*, 2000). Dentre as variações das condições ambientais, o pH é o parâmetro mais sensível na DA dos resíduos. O pH do efluente líquido a partir dos digestores indica a estabilidade do sistema e sua variação também depende da capacidade de tamponamento do mesmo (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2008).

Os sólidos voláteis (SV) representam a porção orgânica do material sólido que pode ser digerido, os sólidos remanescentes são considerados fixos. A porção fixa dos sólidos representa a fração de sólidos não biodegradáveis. A taxa de carregamento efetiva depende dos tipos de resíduos inseridos no digestor. O resíduo alimentar, facilmente degradável, com elevado conteúdo de matéria orgânica solúvel e elevado conteúdo energético por massa seca, possibilita no excesso de amônia e acúmulo de ácidos graxos voláteis. Isso é considerado comum de ocorrer na DA com elevada concentração de sólidos no resíduo alimentar. A co-digestão de resíduos alimentares com biomassa lignocelulósica e/ou a operação em duas fases tem sido adotada como uma solução para resolver este problema (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2000).

A DA de resíduos orgânicos é susceptível a falhas e instabilidades em condições com elevada taxa de carregamento orgânico, decorrente do acúmulo de uma variedade de substratos intermediários e inibitórios, tais como amônia e ácidos graxos voláteis (GUO *et al.*, 2014).

Zhang *et al.* (2007) reporta que a DA de resíduo alimentar atingiu rendimento médio de metano de 435mL/gSV após 28 dias de digestão a 50 °C. Cerca de 80% do rendimento de metano foi obtido após os 10 primeiros dias representando 348 mLCH<sub>4</sub>/gSV.

Babae e Shayegan (2011) utilizaram reator de 70 L com taxa de carregamento de 1,4 kg SV/m<sup>3</sup>/dia e reportaram desempenho estável do digestor com alto rendimento de biogás (0,4 m<sup>3</sup> biogás/kgSV) e de metano (0,25 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kgSV) e redução de SV de 88%. Conforme a taxa de carregamento orgânico foi aumentada, a degradação de SV e a produção de biogás diminuíram.

Zhang *et al.* (2013) reportaram que a co-digestão de resíduos alimentares com outros resíduos em um mesmo digestor tem se tornado muito popular com a vantagem de ajustar a relação C/N. Não obstante, Demirel e Scherer (2008) reportaram que a DA de substratos orgânicos prontamente biodegradável, pode resultar em falha no processo. Na ausência de um agente de tamponamento, para ajuste do pH e da adição externa de quantidades apropriadas de nutrientes, geralmente tem adicionado metais como Fe, Ni, Co e Mo, em concentrações traço. Nesse sentido, a co-fermentação de diferentes substratos pode ser benéfica uma vez que pode diluir os compostos tóxicos, aumentar o equilíbrio de nutrientes, e o efeito sinérgico dos micro-organismos (RAZAVIARANI e BUCHANAN, 2014).

### 2.7.1 Acúmulo de Ácidos Orgânicos

A fase de hidrólise em sistemas anaeróbios, na maioria das vezes tem uma tendência a condições ineficientes. O processo ocorre primariamente, através da atividade extracelular das enzimas secretadas por bactérias hidrolíticas, ligado a substratos poliméricos (STRAUBER *et al.*, 2012). Conseqüentemente, os mesmos organismos executam a rota acidogênica até adquirir os produtos oriundos do processo de fermentação da hidrólise.

O produto formado durante a fermentação primária compreende a vários ácidos graxos voláteis (AGV's), álcoois, hidrogênio e dióxido de carbono. No entanto, as proporções dos respectivos componentes podem diferir significativamente, dependendo das condições do processo, tais como: o tempo de retenção hidráulica, carga orgânica, desequilíbrios,

sobrecarga, concentração de substrato, temperatura e pH, acompanhados por ácido propiônico. Geralmente, a concentração do ácido propiônico deve ser mantido abaixo de 1,5 g/L, e a relação ácido propiônico/acético foi sugerido ser um indicador de falhas em digestores. No entanto, em casos raros o ácido propiônico não é considerado um indicador confiável de desequilíbrio dos processos. Sabe-se que a taxa de produção do etanol e do ácido butírico são acompanhados pela produção de hidrogênio, relativamente maior que a produção do ácido propiônico. Logo, o ácido propiônico é considerado um metabolito inferior (STRAUBER *et al.*, 2012). Há uma correlação elevada na pressão parcial de hidrogênio com o aumento na produção de ácido propiônico. Supõe-se que a pressão de hidrogênio regula as reações metabólicas, como o teor de hidrogênio determina a proporção em relação ao NAD oxidado para o NADH reduzido dentro das células bacterianas. Entretanto, a produção de ácido propiônico nem sempre foi encontrada para ser relacionada com a elevada pressão parcial de hidrogênio, mas este efeito parece ser dependente do valor de pH (STRAUBER *et al.*, 2012).

O acúmulo de ácidos orgânicos ocorre em estágios intermediários no processo de digestão anaeróbia, na acetogênese e na metanogênese. Na acetogênese ocorre a formação de propionato e butirato pelas bactérias degradadoras, e na metanogênese nas quais estão inter-relacionadas em sintrofia. O propionato e o butirato são importantes intermediários sintróficos nas reações, na termodinâmica e na degradação, considerados limitantes nas etapas da digestão anaeróbia (KIDA *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 2010). O acúmulo de AGVs tem sido a principal causa de desequilíbrio entre a taxa de produção de metano e o consumo do mesmo (AHRING *et al.*, 1995).

Lee *et al.* (2015) reportaram que o ácido acético é conhecido como importante intermediário para o processo de digestão anaeróbia, uma vez que está relacionado com os produtos finais, o metano e o dióxido de carbono; e o ácido propiônico é importante para o fluxo de abastecimento de elétrons. Os autores notaram que a degradação completa do ácido propiônico ocorreu em baixa concentração de ácido acético (< 100 mg/L), mas quando houve elevada concentração de ácido acético (4.700 mg/L) a degradação do ácido propiônico foi inibida.

Komemoto *et al.* (2009), relata que a produção de ácidos graxos voláteis difere entre as diversas condições da temperatura. O ácido láctico apresenta a maior concentração de todo o AGV produzido a partir do início de operação do digestor tratando resíduo. O teste com ácido

acético foi produzido no início do período experimental com continua formação. Em contraste, o ácido butírico foi produzido tardiamente e o ácido propiônico foi observado com concentrações abaixo de 1000 mg/L.

A concentração de ácido acético foi relativamente elevada de 1000 a 2000 mg/L, sob condições mesofílicas de 35 °C e 45 °C, com conseqüente diminuição após 4 a 6 dias. A rápida diminuição nas concentrações dos ácidos láctico e acético coincidiu com a produção de biogás, sugerindo que estes foram convertidos. As concentrações do ácido butírico atingiu o máximo de 6195 mg/L após sete dias, indicando não ser susceptível em contribuir com a produção do biogás (KOMEMOTO *et al.*, 2009).

### 2.7.2 Inibição por Amônia

A inibição do processo de digestão anaeróbia por amônia é uma ocorrência comum durante a digestão anaeróbia, principalmente em substratos ricos em proteína, a exemplo de resíduo alimentar (ANGELIDAKI e AHRING, 1993).

Estudos têm relatado que para a metanogênese ocorrer é necessária a metade da concentração máxima inibitória, no qual o nitrogênio amoniacal varia de 4,0 a 12,8 g NH<sub>4</sub>-N/L (GALERIA WINTER, 1997; SUNG e LIU, 2003). Hendriksen e Ahring (1991) determinaram que os níveis da concentração inibitória para a metanogênese foi de 6 g NH<sub>4</sub>-N/L, e a inibição completa foi observada com 9,0 g NH<sub>4</sub>-N/L.

As concentrações de amônia livre (NH<sub>3</sub>) têm sido responsáveis pela inibição de amônia nos sistemas de tratamentos (ANGELIDAKI e AHRING, 1993). Essa concentração indica ser dependente de três parâmetros: da concentração de amônia total, pH e temperatura (HANSEN *et al.*, 1998). Para uma concentração completa de amônia, há um aumento de amônia livre, com conseqüente aumento do pH. À medida que a temperatura de um sistema aumenta a fração do amoníaco total, a forma livre de amônia também aumenta (HANSEN *et al.*, 1998).

A tendência do acúmulo de amônia é de ocasionar mudanças na via de produção do metano, dominada não pelas arqueias acetoclásticas devido à inibição, e sim pela associação sintrófica entre as hidrogenotróficas e as bactérias acetogênicas, consideradas tolerantes a fatores inibitórios (AHRING *et al.*, 1995). Estudos reportam que elevadas concentrações de amônia (>7 g/Kg/d<sup>-1</sup>) tendem a elevar o acúmulo de AGVs, em digestores mesofílicos com tratamento de resíduo alimentar (ZHANG *et al.*, 2010).

A degradação anaeróbia de substratos ricos em proteínas (devida à alta quantidade de íon amônio em equilíbrio com amônia) é frequentemente associada com a instabilidade do processo, indicado pela reduzida produção de biogás e/ou conteúdo de metano, flutuações no pH e alcalinidade, e acúmulo de AGVs (RAJAGOPAL *et al.*, 2013). Algumas soluções vêm sendo sugeridas para se gerenciar as complicações associadas aos materiais ricos em nitrogênio, incluindo diluição do substrato, *air-stripping*, recuperação da amônia através da integração de células microbianas de dessalinização e inclusão de material com capacidade de troca iônica ou fibra de carbono (RAJAGOPAL *et al.*, 2013). Além disso, a importância da adaptação microbiana a altas concentrações de amônia tem sido enfatizada na literatura (RAJAGOPAL *et al.*, 2013), indicando a necessidade de permitir a aclimação dos microorganismos às condições prevalentes para obter sucesso na operação.

A resposta do digestor à concentração do íon amônio depende da comunidade microbiana, ou seja, influenciada pelo tipo de inóculo, pelas características do substrato e parâmetros operacionais. As concentrações de amônia total e livre, juntamente com a temperatura, têm sido identificadas como os principais fatores que influenciam e determinam a estrutura da comunidade microbiana em digestores anaeróbios em escala plena (DE VRIEZE *et al.*, 2015).

Os efeitos inibitórios de amônia sobre o consórcio microbiano também são considerados em ter um impacto significativo nos estágios finais da degradação, envolvendo a atividade das metanogênicas utilizadoras de hidrogênio/formiato (hidrogenotróficas) ou metanogênicas utilizadoras de acetato (acetoclásticas), onde as acetoclásticas (como *Methanosaeta* sp. e algumas espécies de *Methanosarcina* sp.) são consideradas mais sensíveis à amônia (RAJAGOPAL *et al.*, 2013).

A produção de biogás através da degradação anaeróbia dos compostos orgânicos demanda comunidades microbianas complexas, com estreita cooperação interespecífica. A atividade metanogênica reduzida, subsequentemente influencia rotas de reações nos níveis mais altos da cadeia de degradação. As condições resultam na inibição da comunidade de metanogênicas que utilizam altas concentrações de amônia, podendo resultar no aparecimento de competidores microbianos pelo acetato. Estudos têm sugerido que, estas condições promovem o desenvolvimento das bactérias sintróficas oxidadoras de acetato (WESTERHOLM *et al.*, 2015). A etapa inicial da reação de oxidação sintrófica envolve a oxidação de acetato a hidrogênio e dióxido de carbono, e formiato pelas bactérias sintróficas oxidadoras de acetato, seguida do consumo destes produtos pelas metanogênicas hidrogenotróficas para a geração de

metano. As bactérias capazes de realizar a oxidação sintrófica do acetato são as bactérias termofílicas (*Thermacetogenium phaeum* e *Pseudothermotoga lettingae*), termotolerante (*Tepidanaerobacter acetatoxydans*) e as mesofílicas (*Clostridium ultunense* e *Syntrophaceticus schinkii*) (WESTERHOLM *et al.*, 2016).

As bactérias sintróficas oxidadoras de acetato são consideradas de crescimento lento (HATORI, 2008), podendo ser uma desvantagem na competição pelo acetato com as metanogênicas acetoclásticas. Não obstante, as metanogênicas hidrogenotróficas e a maioria das sintróficas oxidadoras de acetato possuem alta tolerância à amônia (WESTERHOLM *et al.*, 2016), uma característica que provavelmente as tornam eficientes competidoras em sistemas submetidos às perturbações com elevada concentração de amônia.

## ***2.8 Importância da Comunidade Microbiana nos Sistemas de Tratamento Anaeróbio de Resíduos***

A identificação, análise e monitoramento da comunidade microbiana de bactérias e arqueias é fundamental para prever processos de estabilidade, instabilidade e explicar o desempenho do sistema. O desequilíbrio de um nível trófico pode afetar toda a comunidade microbiana, resultando em desequilíbrios ou falhas no processo. Portanto, a caracterização da composição e estrutura da comunidade microbiana é crítica para analisar e melhorar a eficiência da digestão anaeróbia (VANDEVIVERE *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2013; QIAOYING *et al.*, 2013).

É reconhecido que apenas uma pequena parcela da diversidade microbiana pode ser estudada por meio de métodos de cultivo. A limitação para o cultivo está associada a diversos fatores, tais como: desconhecimento das necessidades nutricionais; características peculiares do habitat, que não são mantidas; e interações com o meio biótico, com outros micro-organismos e condições abióticas, fatores físicos e químicos (XU, 2006). Entretanto, ferramentas de biologia molecular têm sido utilizadas com base nas variações e análise da sequência de nucleotídeos presentes no gene RNAr 16S, por conter regiões conservadas e variadas (exclusivas de uma única espécie por exemplo), e contribuir para a caracterização da diversidade microbiana (MANDIGAN *et al.*, 2010).

Com base no rápido desenvolvimento tecnológico, tem-se desenvolvido plataformas para sequenciamento de nova geração (NGS). A metagenômica torna possível o estudo aprofundado da diversidade e abundância da comunidade microbiana, uma vez que podem ser

geradas milhares de sequências a partir de uma única amostra, sendo possível detectar aqueles micro-organismos que estão em baixa abundância ou que sejam raros na amostra. Portanto, podem fornecer informações detalhadas e significativas da composição e estrutura da comunidade em reatores anaeróbios (CHO *et al.*, 2013).

Vários estudos revelaram a importância de investigar e monitorar a comunidade microbiana em digestores anaeróbios, por meio de plataformas, conforme quadro 2-5.

**Quadro 2-5.** Estudos que investigaram a comunidade microbiana de digestores anaeróbios de tratamento de resíduos orgânicos

Substrato	Reator (escala)	Temperatura	Ferramentas utilizadas	Grupos de Micro-organismos	Referência
Lodo de planta de tratamento municipal de RSU (Suécia)	Laboratorial (45 L e 45 L)	Mesofílico e termofílico	Sequenciamento, ARDRA	<b>Mesofílico</b> ( <i>Bacteroidetes</i> (34%), <i>Chloroflexi</i> (27%), <i>Firmicutes</i> , <i>Clostridia</i> (5%), <i>Firmicutes Bacilli</i> (4%), <i>Spirochaetes</i> (5%), <i>Thermotogae</i> (4%), <i>Actinobacteria</i> (4%), <i>delta Proteobactéria</i> (4%)); <b>Termofílico</b> ( <i>Thermotogae</i> (61%), <i>Firmicutes Clostridia</i> (19%), <i>Bacteroidetes</i> (10%), <i>Firmicutes Bacilli</i> (5%)); <b>Mesofílico</b> ( <i>Methanospirillum</i> (55%), <i>Methanoculleus</i> (18%), <i>Methanosarcina</i> (18%), <i>Crenarchaeota</i> (3%), <i>Thermoplasma</i> (3%), <i>Methanomethylovorans</i> (3%); <b>Termofílico</b> ( <i>Methanosarcina</i> (58%), <i>Methanobacterium</i> (32%), <i>Methanoculleus</i> (10%))	Levén <i>et al.</i> (2007)
Resíduo alimentar e lodo de esgoto (China)	Laboratorial (20 L)	Mesofílico	Pirosequenciamento-454	Inóculos sem aquecimento: Lodo de esgoto [ <i>Proteobacteria</i> (65,4%), <i>Actinobacteria</i> (11,0%), <i>Bacteroidetes</i> (11,0%), <i>Firmicutes</i> (6,3%) e <i>Fusobacteria</i> (3,3%)]; Resíduo alimentar [ <i>Firmicutes</i> (66,2%), <i>Cyanobacteria</i> (21,2%) e <i>Proteobacteria</i> (12,4%)]; Inóculos aquecidos (mistura de resíduo alimentar e lodo de esgoto) [ <i>Proteobacteria</i> (54,2%), <i>Bacteroidetes</i> (24,7%), <i>Firmicutes</i> (4,8%) e TM7 (3,4%)]. Operação 0 horas [ <i>Proteobacteria</i> 50% ( <i>Betaproteobacteria</i> 34% e <i>Gammaproteobacteria</i> 11%), <i>Bacteroidetes</i> (25%) e <i>Firmicutes</i> (3,7%)]; Pós 6 horas [as sequências que pertencem a outros grupos diminuíram drasticamente, exceto <i>Firmicutes</i> (97%)]	Wan <i>et al.</i> (2012)
Resíduo alimentar de restaurante (Coreia)	Laboratorial (60 L)	Mesofílico	Pirosequenciamento-454	Metanogênicas espécies somente <i>Methanosphaera</i> (57%), <i>Ferroglabus</i> (16%), <i>Methanomicrobium</i> (10,1%), <i>Methanosalsum</i> (5,6%), <i>Methanolinea</i> (4,1%), <i>Ferroplasma</i> (2,6%) e <i>Methanosphaerula</i> (1,7%)	Cho <i>et al.</i> (2013)

Resíduo alimentar de cafeteria (China)	Laboratorial (60 L)	Mesofílico e termofílico	Pirosequenciamento-454	<p><b>Mesofílico</b> [<i>Chloroflexi</i> (8,93%), <i>Actinobacteria</i> (4,49%), <i>Spirochaetes</i> (11,28%)];</p> <p><b>Termofílico</b> [<i>Chloroflexi</i> (0,66%), <i>Actinobacteria</i> (1,38%), <i>Spirochaetes</i> (0,18%).]</p>	Guo et al. (2014)
Resíduo alimentar (China)	Laboratorial R1 (60 L-5%ST), R2 (60 L-15%ST) e R3 (60 L-20%ST)	Mesofílico	Pirosequenciamento-454	<p><b>ST 5%: Bacteroidetes</b> (<i>Barnesiella</i> 2,83%, <i>Bacteroides</i> 0,54%, <i>Bacteroidales</i> 0,43%, <i>Marinilabiaceae</i> 0,37%); <b>Chloroflexi</b> (<i>Anaerolineaceae</i> 64,99%, <i>Erysipelotrichaceae</i> 7,17%, <i>Clostridiales</i> 1,73%, <i>Christensenellaceae</i> 0,30%, <i>Anaerobranca</i> 0,11%); <b>Firmicutes</b> (<i>Ruminococcaceae</i> 1,11%, <i>Gelria</i> 0,85%, <i>Fastidiosipila</i> 0,30%, <i>Lachnospiraceae</i> 0,13%, <i>Lutispora</i> 0,09%); <b>Proteobacteria</b> (<i>Novosphingobium</i> 0,21%, <i>Rhizobiales</i> 0,07%); <b>Spirochaetes</b> (<i>Spirochaeta</i> 0,28%, <i>Spirochaetes</i> 0,46%); <b>Tenericutes</b> (<i>Acholeplasma</i> 0,40%)</p> <p><b>Methanosarcina</b> (84,4%), <i>Methanoculleus</i> (7,63%); <b>ST 15%: Bacteroidetes</b> (<i>Barnesiella</i> 0,08%, <i>Bacteroides</i> 0,27%, <i>Bacteroidales</i> 0,40%, <i>Marinilabiaceae</i> 0,22%, <i>Parabacteroides</i> 0,06%); <b>Chloroflexi</b> (<i>Anaerolineaceae</i> 58,03%, <i>Erysipelotrichaceae</i> 1,85%, <i>Clostridiales</i> 4,00%, <i>Christensenellaceae</i> 0,14%, <i>Anaerobranca</i> 0,36%); <b>Firmicutes</b> (<i>Ruminococcaceae</i> 0,75%, <i>Gelria</i> 0,85%, <i>Fastidiosipila</i> 0,79%, <i>Lachnospiraceae</i> 0,72%, <i>Lutispora</i> 0,06%); <b>Proteobacteria</b> (<i>Novosphingobium</i> 0,14%, <i>Rhizobiales</i> 0,07%); <b>Spirochaetes</b> (<i>Spirochaeta</i> 0,28%, <i>Spirochaetes</i> 0,06%); <b>Tenericutes</b> (<i>Acholeplasma</i> 1,12%), <i>Methanosarcina</i> (89,5%); <b>ST 20%: Bacteroidetes</b> (<i>Barnesiella</i> 0,00%, <i>Bacteroides</i> 0,82%, <i>Bacteroidales</i> 1,54%, <i>Marinilabiaceae</i> 0,61%, <i>Parabacteroides</i> 0,34%); <b>Chloroflexi</b> (<i>Anaerolineaceae</i> 31,37%, <i>Erysipelotrichaceae</i> 2,41%, <i>Clostridiales</i> 3,88%, <i>Christensenellaceae</i> 0,18%, <i>Anaerobranca</i> 1,43%); <b>Firmicutes</b> (<i>Ruminococcaceae</i> 0,86%, <i>Gelria</i> 0,45%, <i>Fastidiosipila</i> 1,09%, <i>Lachnospiraceae</i> 0,39%),</p>	Yi et al. (2014)

				<i>Lutispora</i> 0,36%); <b>Proteobacteria</b> ( <i>Novosphingobium</i> 0,77%, <i>Rhizobiales</i> 0,36%); <b>Spirochaetes</b> ( <i>Spirochaeta</i> 0,73%, <i>Spirochaetes</i> 6,98%); <b>Tenericutes</b> ( <i>Acholeplasma</i> 6,75%), <i>Methanosarcina</i> (90,9%), <i>Methanoculleus</i> (2,91%)	
<b>Tratamento resíduos orgânicos doméstico (Brasil)</b>	<b>Escala laboratorial</b> <b>Dois reatores contínuos de 20 L</b> <b>40% (w/v) resíduos de frutas e farelos; e</b> <b>60% (v/v) lodo de ETE</b>	<b>Mesofílico</b>	<b>Sequenciador MegaBace 1000 capilaridade</b>	<b>Inóculo LC</b> ( <i>Firmicutes</i> 58,2%, <i>Bacteroidetes</i> 32,0%, <i>Proteobacteria</i> 4,7% e <i>Thermotogae</i> 1,2%); <b>Resíduo orgânico doméstico</b> ( <i>Firmicutes</i> 60,0%, <i>Bacteroidetes</i> 6,7%, <i>Proteobacteria</i> 30,7% e <i>Cyanobacteria</i> 2,7%); <b>44 dias de operação OT44</b> ( <i>Firmicutes</i> 33%, <i>Bacteroidetes</i> 2,5%, <i>Proteobacteria</i> 57,5%, <i>Actinobacteria</i> 3,8% e <i>Synergistetes</i> 2,5%); <b>90 dias de operação OT90</b> ( <i>Firmicutes</i> 68%, <i>Bacteroidetes</i> 6,5%, <i>Proteobacteria</i> 23,5% e <i>Deinococcus Thermus</i> 2,0%)	<b>Cardinali-Rezende et al. (2009)</b>
<b>Resíduo alimentar (Coreia)</b>	<b>Escala laboratorial (6 L) – único estágio</b>	<b>Mesofílico</b>	<b>Pirosequenciamento-454</b>	<b>Fase I:</b> <i>Chloroflexi</i> (63,95%), <i>Thermotogae</i> (5,56%), <i>Proteobacteria</i> (3,63%), <i>Bacteroidetes</i> (3,22%), <i>Synergistetes</i> (2,63%), <i>Firmicutes</i> (2,41%) e <i>Actinobacteria</i> (0,77%). <b>Alterações nesta fase:</b> <i>Chloroflexi</i> (19,38%), <i>Bacteroidetes</i> (13,37%), <i>Firmicutes</i> (8,27%), <i>Synergistetes</i> (6,31%) e <i>Actinobacteria</i> (2,04%). <b>Fase II:</b> <i>Chloroflexi</i> (7,13%), <i>Bacteroidetes</i> (35,38%), <i>Firmicutes</i> (15,947%), <i>Synergistetes</i> (27,88%) e <i>Actinobacteria</i> (4,95%)	<b>Jang et al. (2014)</b>
<b>Fração orgânica de RSU (Espanha)</b>	<b>Escala plena*</b>	<b>Mesofílico</b>	<b>Pirosequenciamento-454</b>	<b>Antes do Start-up:</b> <i>Firmicutes</i> <b>40,2%</b> : <i>Clostridiales</i> 29,1%, <i>Clostridiaceae incertae sedis</i> XI 21,5%, <i>Peptostreptococcaceae</i> 3,19%, <i>Ruminococcaceae</i> 1,32%, <i>Lactobacillales</i> 8,37%: <i>Enterococcaceae</i> 3,65%, <i>Lactobacillaceae</i> 1,89%, <i>Leuconostocaceae</i> 1,44%, <i>Carnobacteriaceae</i> 0,64%, <i>Streptococcaceae</i> 0,41%, <i>Bacillales</i> 1,88%: <i>Bacillaceae</i> 0,67%, <i>Bacillaceae</i> 1 0,36% e <i>Planococcaceae</i> 0,46%, <i>Erysipelotrichales</i> 0,79%: <i>Erysipelotrichales</i> 0,79%; <b>Bacteroidetes</b> <b>55,09%</b> : <i>Bacteriodales</i> 55%;	<b>Cardinali-Rezende et al. (2016)</b>

				<p><i>Porphyromonadaceae</i> 54,67%; <b>Actinobacteria</b> <b>3,43%:</b> <i>Actinomycetales</i> 3,33%, <i>Actinomycetaceae</i> 2,86%; <b>Proteobacteria</b> <b>1,08%:</b> <i>Pseudomonadales</i> 0,51%; <i>Pseudomonadaceae</i> 0,46%; <i>Desulfobacteriales</i> 0,26%; <i>Desulfobulbaceae</i> 0,26%; <b>Chloroflexi</b> <b>0,09%:</b> <i>Anaerolineales</i> 0,08%; <i>Anaerolineaceae</i> 0,08%; <b>Durante operação do biodigestor:</b> <b>Firmicutes</b> <b>78,76%:</b> <i>Clostridiales</i> 69,3%; <i>Ruminococcaceae</i> 46,5%, <i>Clostridiaceae incertae sedis</i> XI 10,13%, <i>Incertae sedis</i> XI 3.51%, <i>Eubacteriaceae</i> 2,64%, <i>Peptostreptococcaceae</i> 0,98% e <i>Lachnospiraceae</i> 1,56%. <i>Lactobacillales</i> 5,43%; <i>Incertae sedis</i> XII 0,55%; <i>Lactobacillaceae</i> 1,38%, <i>Leuconostocaceae</i> 0,77%, <i>Enterococcaceae</i> 0,92%; <i>Streptococcaceae</i> 0,63%, <i>Aerococcaceae</i> 1,18% e <i>Carnobacteriaceae</i> 0,54%, <i>Erysipelotrichales</i> 2,79%; <i>Erysipelotrichaceae</i> 2,79%. <b>Bacteroides</b> <b>18,65%:</b> <i>Bacteroidales</i> 13,55%; <i>Porphyromonadaceae</i> 13,10%, <i>Flavobacteriales</i> 5,06%; <i>Cryomorphaceae</i> 4,76%; <b>Actinobacteria</b> <b>2,09%:</b> <i>Actinomycetales</i> 1,99%, <i>Actinomycetaceae</i> 1,84%.</p>	
Resíduo alimentar (Massachusetts - EUA)	Escala laboratório (2 L)	Mesofílico	Roche 454	<p><i>Firmicutes</i> máximo de 80%; <i>Sporanaerobacter</i> 34%; <i>Bacterioidetes</i> 25%; <i>Anaerolinaceae</i> 10%; <i>Actinobacteria</i> 10%; <i>Tenericutes</i> 15%; <i>Synergistetes</i> 5%; <i>Peptococcaceae</i> 5%; <i>Methanosaeta</i> 80%, <i>Methanosarcina</i> 66%, <i>Methanobacteriales</i> 20%, <i>Methanomicrobiales</i> 25%, <i>Methanomassiliicoccales</i> 6%.</p>	Dang et al. (2016)
Resíduo alimentar (China)	Escala laboratório (30 L)	Mesofílico	Pirosequenciamento-454	<p><i>Bacterioidetes</i> 21 ± 28%, <i>Firmicutes</i> 27 ± 41%, <i>Chloroflexi</i> 18,5 ± 11%, <i>Spirochaetae</i> 7,5 ± 1%, <i>Synergistete</i> 6 ± 4% e <i>Tenericutes</i> 13,3 ± 1%, <i>Methanotherix</i> 46,97%, <i>Methanospirillum</i> 35,35% e <i>Methanoculleus</i> 9,89%</p>	Li et al. (2016)
Resíduo alimentar (Brasil)	Escala de demonstração (18,8	Mesofílico	Miseq/Illumina	<p><i>Firmicutes</i> 30-40%, <i>Proteobacteria</i> 10-20%, <i>Chloroflexi</i> 15%, <i>Bacterioidetes</i> 8%,</p>	Martins et al. (2016)

	m <sup>3</sup> )			<i>Synergistetes</i> 7%, <i>Ruminococcaceae</i> 31,7%, <i>Lachnospiraceae</i> e <i>Mogibacteriaceae</i> 6,8%, <i>Peptococcaceae</i> 4-7%, <i>Syntrophomonadaceae</i> 2-4%, <i>Syntrophus</i> 3-7,2%. Maior que 1%: <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosaeta</i> e <i>Methanospirillum</i>	
<b>Resíduo alimentar (Noruega)</b>	<b>Escala laboratório 4 reatores 10 L</b>	<b>2 reatores mesofílico 2 reatores termofílicos</b>	<b>MiSeq/Illumina</b>	<b>Mesofílico:</b> <i>Firmicutes</i> 25 ± 75%, <i>Chloroflexi</i> 6 ± 54%, <i>Bacteroidetes</i> 7 ± 16%, <i>Actinobacteria</i> 2 ± 3%, <i>Clostridiaceae</i> 65%; <i>Methanosaeta</i> 65%, <i>Methanobacterium</i> 32%; <b>Termofílico:</b> <i>Firmicutes</i> 35%, <i>Thermotoga</i> 40%, <i>Coprothermobacter</i> 49%, <i>Thermacetogenium</i> 28%, <b><i>Syntrophomonas</i> 12 ± 40%</b> <b><i>Caldicoprobacter</i> 25%</b> , <b><i>Tepidimicrobium</i> 23%</b> , <b><i>Synergistetes</i> 7 ± 11%</b> , <i>Methanothermobacter</i> 96 ± 97%, <i>Methanosarcina</i> 1%.	<b>Zamanzadeh et al. (2016)</b>
<b>Palha de arroz (China)</b>	<b>Escala de bancada (0,5 L) com volume de trabalho de 0,2 L</b>	<b>Mesofílico</b>	<b>MiSeq/Illumina</b>	<i>Firmicutes</i> (Ni - 3,3% e 1,3%), <i>Proteobacteria</i> (Ni - 3,5% e 9,2%); <i>Proteobacteria</i> (Fe - 3,4%, Mo-6,6%); <i>Methanosaeta</i> (Fe 8,51%, Mo 10,9%, Ni 4,9%); <i>Methanosaeta</i> (Ni - 9,4%); <i>Methanobacterium</i> (Ni - houve decréscimo de 60,9 para 53,7%)	<b>Cai et al. (2017)</b>
<b>Resíduo alimentar (França)</b>	<b>Escala de bancada (frascos de 520 mL)</b>	<b>Mesofílico</b>	<b>Ion Torrent/Life</b>	Ria 1: <i>Firmicutes</i> 96%, <i>Proteobacteria</i> 4%, <i>Bacteroidetes</i> 0,1%. Ria 2: <i>Proteobacteria</i> 58%, <i>Firmicutes</i> 30%, <i>Bacteroidetes</i> 6%, <i>Spirochaetes</i> 1%. Veg 1: <i>Firmicutes</i> 66%, <i>Proteobacteria</i> 38%, <i>Bacteroidetes</i> 4%. Veg 2: <i>Firmicutes</i> 43%, <i>Proteobacteria</i> 50%, <i>Bacteroidetes</i> 6%. Bio 1: <i>Firmicutes</i> 55%, <i>Proteobacteria</i> 34%, <i>Bacteroidetes</i> 8%. Bio 2: <i>Proteobacteria</i> 58%, <i>Firmicutes</i> 22%, <i>Bacteroidetes</i> 17% e <i>Actinobacteria</i> 2%.	<b>Figastiva et al. (2017)</b>

Em negrito destaca-se os trabalhos que usaram digestor anaeróbico para tratar resíduo alimentar e técnica de sequenciamento massivo para estudar a comunidade microbiana.

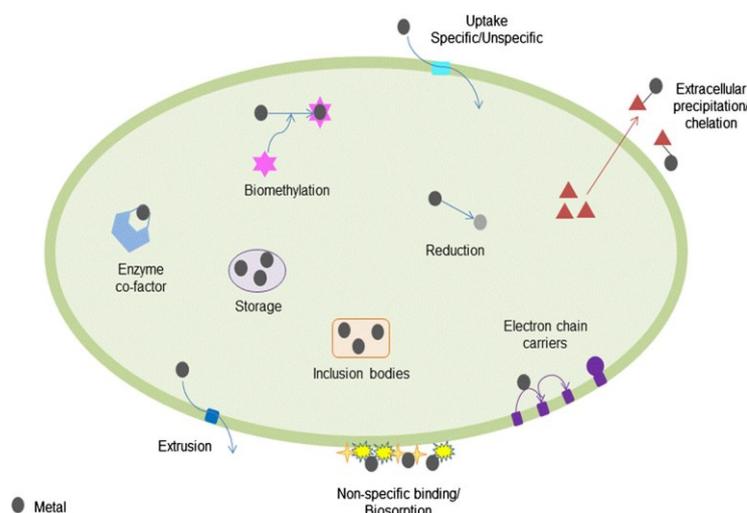
\*volume do reator não foi informado, somente altura (12m).

## 2.9 Metais Essenciais: Macro e Micronutrientes

Os metais de transição são conhecidos por terem funções essenciais de nutrientes nos micro-organismos, tais como: Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, V, W e Zn. Os metais de transição são assim classificados por terem capacidade de transitar entre diferentes estados de oxidação, com estabilidade significativa. Possuem orbitais incompletos e têm a capacidade de formar ligações coordenadas (MAIER *et al.*, 2009).

Os nutrientes ‘metálicos’ podem ser classificados com base na sua concentração intracelular: macronutrientes, cátions (K, Mg, Ca) e micronutrientes (Mn, Fe, Co, Cu, Mo, Ni, Se, W). As concentrações de metais nas células podem variar de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ M para os macronutrientes ou cátions, e de  $10^{-6}$  a  $10^{-15}$  para os micronutrientes. Essas concentrações podem diferenciar de um para o outro (WILLIAMS e SILVA, 2000; MADIGAN, 2004).

Em geral, os metais essenciais são requeridos para a catálise enzimática, transporte de moléculas, estrutura protéica, neutralização de carga e controle de pressão osmótica. Os micro-organismos possuem mecanismos de captura de elementos traço, quando são requeridos para suprir suas demandas funcionais. Um elemento pode ser capturado por meio de cofatores enzimáticos, inclusão de corpos internos, transporte de membranas, assim como, desempenhar o papel de doadores ou aceptores de elétrons; bem como passar por processo de redução e biometilação. Quando necessitam expulsar quaisquer elementos, estes ocorrem por precipitação extracelular e/ou extrusão para expulsão de elementos em excesso ou prejudicial (MAIER *et al.*, 2009; PAULO *et al.*, 2015) (Figura 2-4).



Fonte: Paulo *et al.* (2015)

**Figura 2-4.** Esquema de interação entre células e metais

A biometilação de Hg, Pb, Tl, Pd, Pt, Au, Sn, Cr, As e Se foi observada como um mecanismo de desintoxicação em células microbianas (OLESZIEWICZ e SHARMA, 1990). Os micro-organismos também são capazes de capturar metais por meio de inclusão de corpos internos, enquanto, outros são capazes de reduzir para um estado de oxidação menos tóxico, como por exemplo, *Penicillium chrysogenum* que pode reduzir a prata (HAFERBURG e KOTHE, 2007).

### 2.9.1 Funções dos Elementos Traço no Processo Biológico de Digestão Anaeróbia

A suplementação de elementos traços tem sido utilizada em sistemas de digestão anaeróbia, como medida para aumentar o metabolismo microbiano e conseqüentemente, maior produção no teor de metano, devido às propriedades funcionais (Quadro 2-6). Os elementos traço são requeridos em quantidades suficientes para suportar o crescimento microbiano e, portanto, garantir a eficiência no desempenho do processo de tratamento. A exemplo, do ferro (Fe), níquel (Ni) e cobalto (Co), seus efeitos têm sido extensivamente reportados na literatura (OLESZKIEWICZ e SHARMA, 1990; POBEHEIM *et al.*, 2011; QIANG *et al.*, 2012; GUSTAVSSON *et al.*, 2012; FACCHIN *et al.*, 2013).

A importância do Fe depende de sua propriedade redox e do envolvimento no metabolismo energético (TAKASHIMA e SPEECE, 1989). O Fe é utilizado no sistema de transporte dos micro-organismos para a conversão de CO<sub>2</sub> em CO<sub>4</sub>, podendo atuar como doador de elétrons (VINTILOIU *et al.*, 2013). O Fe também tem sido utilizado com frequência em reatores anaeróbios como suplementação, por demonstrar atuação ativa na precipitação de sulfeto, além de controlar os níveis de hidrogênio no biogás (GUSTAVSSON *et al.*, 2014).

Um corrinóide, como a vitamina B12 contendo o íon Co, pode ligar-se à coenzima metilase que catalisa a formação de metano em ambas as vias da metanogênese acetoclástica e hidrogenotrófica (SCHONHEIT *et al.*, 1979; KIDA *et al.*, 2001). Embora o Ni tenha sido considerado como não essencial para o crescimento microbiano, uma coenzima com baixo peso molecular, a F<sub>430</sub>, foi descoberta em extratos com *Methanobacterium thermoautotrophicum*, nessa situação foi encontrada quantidades essenciais de níquel (FRIEDMANN *et al.*, 1990).

O manganês (Mn) atua como receptor de elétrons nos processos de respiração anaeróbia (LANGENHOFF *et al.*, 1997), enquanto o zinco (Zn) participa na função de enzimas envolvidas na metanogênese, como a coenzima M metiltransferase (SAUER e TAUER, 2000). Zinco (Zn), cobre (Cu) e níquel (Ni) foram encontrados em uma única hidrogenase

(JARREL e KALMOKOFF, 1988). Há pouca informação disponível na literatura sobre os efeitos positivos do Zn e do Cu sobre as metanogênicas. O Zn foi encontrado em concentrações notavelmente elevadas de 50 a 630 ppm em 10 metanogênicas, enquanto que o Cu estava presente em apenas algumas espécies (SCHERER *et al.*, 1983).

Outros metais traços como W e Mo também são encontrados em enzimas, como a formidase dehidrogenase (FDH), que catalisa a produção de formiato por oxidantes de propionato (BANKS *et al.*, 2012). Algumas metanogênicas contêm enzimas W e Mo para o mesmo propósito (NIES, 1999), *Methanobacterium thermoautotrophicum* contém duas iso-enzimas, formilmetanofurano desidrogenase, uma contendo W e a outra contendo Mo.

A enzima Mo é sintetizada apenas quando Mo está presente no meio de crescimento, enquanto a enzima W é sintetizada quando W ou Mo está disponível, se no meio de crescimento contém Mo, a enzima W conterá Mo em vez de W (HOCHHEIMER *et al.*, 1995). Todas as enzimas contendo W foram encontradas em bactérias e arqueias principalmente, aquelas com metabolismo anaeróbio (NIES, 1995).

Embora, o Se não seja estritamente um metal traço, sua importância como nutriente para sistemas de digestão anaeróbia tem sido discutida na literatura. Jones e Stadtman (1977) reportaram uma relação direta entre o efeito estimulatório do selênio no crescimento, e níveis aumentados da atividade da formato dehidrogenase em *Methanococcus vannielii*, anaeróbio estrito. A deficiência de Se no processo de tratamento anaeróbio pode resultar em limitações de crescimento para algumas metanogênicas, diminuição da atividade microbiana e, em última análise, falha do processo (LEBUHN *et al.*, 2008; WORM *et al.*, 2009). Banks *et al.* (2012) concluíram que o Se e o Co são elementos essenciais para a estabilidade do processo, e estão presentes em quantidade insuficientes no resíduo alimentar.

Gustavsson *et al.* (2011) abordaram os efeitos da suplementação de elementos traço durante o processo de digestão de resíduos de bio-etanol contendo elevados níveis de sulfeto. Concluíram que a suplementação diária com Co (8,5 µM), Ni (3,4 µM) e Fe (9 mM) foram requeridos para a manutenção da estabilidade do processo de digestão para produção de biogás, com taxa de carregamento orgânico de 4,0 g/L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> de sólidos voláteis.

**Quadro 2-6. Elementos traço e suas funções nos micro-organismos**

<b>Elementos Traço</b>	<b>Função Geral nos Micro-organismos</b>	<b>Função na Metanogêneses</b>	<b>Referências</b>
<b>Cobalto (Co)</b>	- Vitamina B <sub>12</sub> ; transcarboxilase (bactérias que metabolizam ácido propiônico); - Presente em corrinoídes; ativador enzimático metálico; ativador carboxil peptidase; requerido para a síntese de vitamina B <sub>12</sub> (cyanocobalamin); CODH; pode inibir o metabolismo.	Metil transferase	Madigan <i>et al.</i> (2004) Shataure <i>et al.</i> (2011)
<b>Ferro (Fe)</b>	- Aceptor de elétrons em citocromos (Fe <sub>3</sub> <sup>+</sup> ); síntese da catalase, peroxidase e acotinase; essencial em hidrogenase ferredoxina, em CODH e FDH; propriedade redox.	CODH, ACS; hidrogenases	Madigan <i>et al.</i> (2004) Shataure <i>et al.</i> (2011)
<b>Molibdênio (Mo)</b>	- Enzimas contendo flavina; nitrogenase, nitrato redutase, sulfito oxidase e algumas formiato desidrogenases, - Presente no FDH; inibidor de bactérias sulfato redutoras; cofator de várias enzimas.	Formiato desidrogenase	Madigan <i>et al.</i> (2004) Shataure <i>et al.</i> (2011)
<b>Níquel (Ni)</b>	- Maioria das hidrogenases; coenzima de F <sub>430</sub> de metanogênicas; monóxido de carbono desidrogenase; cofator de uréase. - Enzima metil- CoM redutase, depende do cofator F <sub>430</sub> no último passo da formação de metano.	CODH; metil CoM redutase; hidrogenases.	Madigan <i>et al.</i> (2004) Shataure <i>et al.</i> (2011)
<b>Selênio (Se)</b>	- Formato desidrogenase; algumas hidrogenases.	Formiato desidrogenase	Madigan <i>et al.</i> (2004)
<b>Manganês (Mn)</b>	- Atividade isocitrica desidrogenase e enzima málica de bactéria; frequente ligação com o magnésio em reações de quinase; estabilização da metil transferase na produção de metano; reação redox; cofator de várias enzimas.	-	Madigan <i>et al.</i> (2004) Shataure <i>et al.</i> (2011)
<b>Tungstênio (W)</b>	Alguns formiato desidrogenases. -Anidrase carbônica; álcool desidrogenase; - Ativador de enzimas metálicas, atividade carbônica de ativador metálico da enzima anidrase carbônica.	-	Madigan <i>et al.</i> (2004)
<b>Zinco (Zn)</b>	- Estimula o crescimento das células com cofator RNA e DNA polimerase; efeito tóxico exacerbado com outros metais e consequente, inibição do metabolismo; produção de metano por hidrogenases,	-	Madigan <i>et al.</i> (2004) Shataure <i>et al.</i> (2011)

### 2.9.2 Efeitos da Adição de Elementos Traço nos Sistemas de Tratamento Anaeróbio

Os elementos traços desempenham papéis essenciais no metabolismo e crescimento microbiano. Atuam como cofatores de enzimas envolvidas na bioquímica de formação do

metano (a exemplo do Fe importante para a enzima hidrogenase, presente nas bactérias produtoras de hidrogênio, e do Ni, presente no Cofator F<sub>430</sub> das metanogênicas), por isso, têm sido considerados necessários para o equilíbrio do processo anaeróbio (POBEHEIM *et al.*, 2010; FACCHIN *et al.*, 2013).

O acúmulo dos inibidores de amônia e AGV's estão intrinsicamente, relacionados às deficiências principalmente, dos elementos traços, tais como: ferro (Fe), molibdênio (Mo), selênio (Se), cobalto (Co), níquel (Ni), tungstênio (W) (ZHANG *et al.*, 2010). Os resíduos orgânicos geralmente contêm baixas concentrações desses elementos, conduzindo a falhas no processo de digestão anaeróbia (FACCHIN *et al.*, 2013) (Tabela 2-4).

**Tabela 2-4.** Concentrações de elementos traços registrados em resíduos alimentares

Elementos traço no resíduo	Cobalto (Co)	Cromo (Cr)	Ferro (Fe)	Molibdênio (Mo)	Níquel (Ni)	Selênio (Se)	Zinco (Zn)	Tungstênio (W)	Unidade
Zhang <i>et al.</i> (2011)	-	0,17	3,17	-	0,17	-	8,27	-	mg/L
Banks <i>et al.</i> (2012)	0,083		173,7	0,29	2,9	0,05	8,11	18,5	mg/L
Qiang <i>et al.</i> (2012)	0,08	-	34,9	-	ND	-	14,0	-	mg/L
Lo <i>et al.</i> (2012)	0,17	4,03	736,83	0,51	ND	-	31,11	ND	mg kg <sup>-1</sup>
Zhang <i>et al.</i> (2012)	ND	0,40	0,0074	0,058	0,44	-	19,19	ND	mg/L
Facchin <i>et al.</i> (2013)	0,2	-	-	1,0	2,0	1,0	-	1,0	mg/kgST
Zhang <i>et al.</i> (2013)	-	-	100,0	-	-	-	160,0	-	mg/L
Yirong <i>et al.</i> (2015)	0,1	-	89	0,37	-	0,17	-	92	mg kg <sup>-1</sup> ST

ND: Não detectado

A seleção de elementos traços é importante para o desenvolvimento dos micro-organismos e conseqüentemente, adição desses para produção de maiores concentrações de metano (CH<sub>4</sub>) principalmente, porque há deficiência de ferro, dentre outros, nos resíduos alimentares (Tabela 2-4).

Trabalhos descritos nas tabelas 2-4 e 2-5 relatam a respeito da importância, e necessidade da adição de elementos traços, como medida para aumentar a produtividade de metano. Entretanto, é preciso uma investigação sobre os elementos de maiores interesses nos processos metabólicos relatados na metanogênese. Os elementos de interesse tais como, o cobalto, ferro, molibdênio e níquel são abundantes e presentes em diferentes enzimas envolvidas na decomposição de compostos orgânicos, e na formação de pequenas moléculas (ex.: celulases, peptinases, carboxilases dehidrogenases entre outras).

Pode-se verificar a partir dos dados da Tabela 2-5, que a concentração dos elementos traços presentes nos resíduos alimentares variam muito de estudo para estudo. Assim, existe uma

necessidade de verificar, se a adição de alguns elementos no reator tratando resíduo alimentar, aumentaria a produção de metano, e de quanto seria este incremento, pois não existe um consenso na literatura do elementos determinantes e suas concentrações.

**Tabela 2-5.** Quantidade de elementos traços requeridos/adicionados em algumas referências

Elementos Traços Requeridos	Cobalto (Co)	Cromo (Cr)	Ferro (Fe)	Molibdênio (Mo)	Níquel (Ni)	Selênio (Se)	Zinco (Zn)	Tungstênio (W)	Unidade
Feng <i>et al.</i> (2010)	0,60	-	0,5 <sup>b</sup>	1,35	1,00	0,08	-	0,18	mgL <sup>-1</sup>
Zhang <i>et al.</i> (2011)	0,18	0,26	149,86	0,634	0,69	-	234,15	-	mgL <sup>-1</sup>
Banks <i>et al.</i> (2012)	1,0	-	5,0	0,2	1,0	0,2	0,2	0,2	mg L <sup>-1</sup>
Jiang <i>et al.</i> (2012)	4,034	-	35,5	0,184	2,825	0,219	20,833	0,18	g L <sup>-1</sup>
Zhang <i>et al.</i> (2012)	<30	165,0	3012,9	23,9	180,8	-	7858,2	<30	µg/L
Facchin <i>et al.</i> (2013)	10	-	-	6	10	1	-	1	(mg/Kg ST) <sup>a</sup>
Yirong <i>et al.</i> (2015)	1,0	-	10,0	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	mL L <sup>-1</sup> a g L <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> As quantidades de elementos traços adicionados foram calculados baseado nos SV contido na fração orgânica,  
<sup>b</sup> (g, L<sup>-1</sup>).

Vários estudos têm investigado a adição de elementos traços em sistemas de digestão anaeróbia de tratamento de resíduo orgânico, com o objetivo de estimular a comunidade microbiana envolvida no processo e, conseqüentemente, incremento na produção de metano. A seguir são listados os estudos mais relevantes conforme tabela 2-6.

Pobeheim *et al.* (2010) compararam seis unidades de biogás na Áustria, tratando biomassa com o lodo de digester anaeróbio em batelada, e adição de elementos traços (cobalto, molibdênio e níquel). As unidades foram alimentadas com 100% de silagem de milho; o reator em batelada foi alimentado com substrato de silagem de milho em variações de 65 a 90%, adicionalmente com esterco, silagem de capim, resíduos de aves, de estrume e de esterco ou combinações desses substratos. O trabalho mostrou a influência da adição dos elementos traço na produção de metano com aumento de 30%. Quando houve a eliminação da adição de níquel no experimento, houve uma redução de metano de 18%, além de ter sido detectado instabilidade do processo de fermentação. Não houve estudo da comunidade microbiana.

**Tabela 2-6.** Estudos com adição de elementos traços para o aumento na produção de metano

Digestor (escala)	Resíduo Orgânico	Adição elementos	Incremento na Produção de Metano	Referência
Laboratorial (3L)	Resíduos de frutas	Fe, Ni e Co	12%	Demirel e Scherer (2011)
Laboratorial (5L)	Resíduo alimentar	*Co, Fe, Mo, Ni, Se e Zn	58%	Banks <i>et al.</i> (2012)
Dois digestores laboratoriais (5L)	Resíduo orgânico, gordura de alimento industrial	Co [0,5 mg/L], Fe[500 mg/L] Após 43 dias Ni [0,25 mg/L]	64 % 67%	Karlsson <i>et al.</i> (2012)
Laboratorial e real	Resíduo orgânico de milho e alimentar	*Co, Mn, Mo, Ni, Se, W e Zn	22%	Lindorf <i>et al.</i> (2012)
Laboratorial (8,5L)	Resíduo alimentar e de matadouro	Co [0,5 mg/L] Ni [0,5 mg/L]	8% 35%	Moestedt <i>et al.</i> (2015)
Laboratorial (4L)	Resíduo alimentar	*Fe, Co, Ni e Mo	35,5%	Zhang <i>et al.</i> (2015)
Laboratorial (0,5L)	Palha de arroz	Mo [10,0 mg/L] Se [0,05 mg/L] Mn [0,5 mg/L] Co [ 10,0 mg/L]	140,8% 137,55 144% 23%	Cai <i>et al.</i> (2016)

\*Adição da combinação de elementos traço. Banks *et al.* (2012) Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Mo [0,2 mg/L], Ni [1,0 mg/L], Se [0,2 mg/L] e Zn [0,2 mg/L]. Lindorf *et al.* (2012): Co [0,01 mg/L], Mn [0,07 mg/L], Mo [0,01 mg/L], Ni [0,03 mg/L], Se [<0,01 mg/L], W [0,01 mg/L] e Zn [0,83 mg/L]; Zhang *et al.* (2015) Fe, Co [1,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L] e Mo [5,0 mg/L].

Demirel e Scherer (2011) relataram que a influência de ferro, níquel e cobalto na produção de biogás em digestor mesofílico em escala laboratório (3 L) tratando resíduos de frutas, após adição de 4 kg/m<sup>3</sup> de FeCl<sub>3</sub>, o teor de AGV's aumentou de 220 para 490 dm<sup>3</sup>kg<sup>-1</sup>, enquanto o rendimento de metano teve um aumento significativo de 48 a 50 para 62%. Os elementos traço desempenharam papel significativo sobre a produção do biogás em digestores operados com biomassa agrícola. Não houve estudo da comunidade microbiana

Banks *et al.* (2012) constataram em digestores mesofílicos de escala laboratorial, tratando resíduo alimentar que quando aumentada a taxa de carregamento orgânico de 2,0 para 3,0 kgSV.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, teve-se um declínio na produção de biogás seguido do aumento de carga; e quando adicionada a suplementação composta de elementos traços (cobalto, selênio, tungstênio, molibdênio, níquel e ferro) a produção volumétrica de biogás aumentou de 1,5 para 3,75 m<sup>3</sup>/d<sup>1</sup>, com o maior carregamento de 5 kgSVL<sup>1</sup>d<sup>1</sup>.

Karlsson *et al.* (2012) relataram estudo em dois reatores anaeróbios, semi-contínuo de 5 L. Os reatores foram alimentados com mistura de resíduo de matadouro (51%), estrume (38%),

resíduo sólido urbano (6%), gordura (3%) e outros resíduos de alimento industrial (2%). O objetivo foi investigar o efeito da adição dos elementos traço (Fe, Co e Ni) em sistema de operação de biogás com oxidação sintrófica de acetato, como via principal para a formação de metano, a partir do acetato. Durante todo o período experimental, a média de concentração do metano (CH<sub>4</sub>) no biogás foi de 64 e 67% para ambos os reatores. A adição de elementos traço aumentou a produção de metano.

Lindorf *et al.* (2012) em digestor trabalhando exclusivamente com culturas energéticas de milho, com capacidade plena de 2000 kW e carga orgânica de 12,0 kgSV/m<sup>3</sup>/d, verificou que a capacidade da produção de metano foi abaixo de 80%. O aumento na produção de biogás não foi possível devido à rápida produção de AGV's após a alimentação com o resíduo. Após aplicação de elementos traços (Fe, Co, Mn, Mo, Ni, Se, W e Zn), a alimentação pôde ser aumentada de forma contínua e plena capacidade foi alcançada em 23 dias, com aumento no rendimento de metano de 98 a 120 m<sup>3</sup>/toneladas, representando aumento de 22%.

Moestedt *et al.* (2015) estudaram dois reatores anaeróbios mesofílicos escala laboratorial, ambos com 8,5 L tratando a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos e resíduos de matadouro. O principal objetivo foi aumentar o entendimento sobre a relação da adição de elementos traço sobre a produção de biogás, mas também o seu papel com possíveis efeitos sobre a viscosidade de líquidos no reator e a dinâmica da estrutura da comunidade microbiana. Foi utilizado uma solução mistura dos elementos traços (Ni [0,4-0,5 mg/L], Co [0,5 mg/L] e Fe [300 mg/L]). Quando houve o consumo dos AGV's, a produção de metano foi elevada com adição de Co em mais de 8%; e quando adicionado o níquel, teve um aumento significativo de 35% de metano. A adição combinada dos elementos traço (Co e Ni) foi benéfica com produção mais acelerada de biogás, quando comparado à mistura do Ni e Fe.

### 3 JUSTIFICATIVA

Na gestão sustentável dos resíduos sólidos urbanos (RSU), a separação do resíduo orgânico e sua posterior conversão em biogás (energia) fornece solução para valorização do resíduo, além de solução ambiental. A degradação da fração orgânica dos RSU gera lixiviados, e quando não dispostos de forma adequada contaminam o meio ambiente. A digestão anaeróbia é uma solução viável e sustentável para a valorização dos diferentes tipos de resíduos orgânicos, pois tem a possibilidade de converter o resíduo em energia. O resíduo alimentar é caracterizado pela elevada biodegradabilidade e conteúdo de nutrientes, portanto adequado para o tratamento anaeróbio (ZHANG *et al.*, 2011).

O processo de digestão anaeróbia converte o resíduo alimentar em energia, com vantagens de baixo custo e baixa produção residual (MORERO *et al.*, 2015). O biogás gerado a partir de resíduo alimentar pode ser valorizado em vários tipos de uso de energia, tais como: eletricidade, gás para fins domésticos e combustível veicular (LIN *et al.*, 2013; WOON *et al.*, 2016). O potencial bioquímico de metano de resíduo alimentar é de aproximadamente 0,44 a 0,5 L CH<sub>4</sub>/gSV (ZHANG *et al.*, 2011).

Contudo, reatores anaeróbios são frequentemente encontrados com acúmulo de ácidos graxos voláteis, baixos níveis de pH e instabilidade operacional. Esses fatores podem ocasionar em falhas no processo, decorrentes dos elevados índices de carboidrato e gorduras contidos no substrato. A suplementação de elementos traço (Co, Ni, Fe e Mo) pode evitar ou diminuir o acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV's), estimulando a atividade da comunidade microbiana, durante as fases do processo anaeróbio de hidrólise, acidogênese e metanogênese (PATIDAR e TARE 2004; PATIDAR e TARE 2006; FENG *et al.*, 2010). Por isso, é fundamental o estudo da comunidade microbiana de bactérias e arqueias, responsáveis pelo processo anaeróbio, para posteriormente adequar a otimização de operação do biodigestor anaeróbio, associado ao incremento na produção de metano.

## 4 PREMISSAS, HIPÓTESES E OBJETIVOS

### 4.1 PREMISAS

- i. A eficiência de um digestor depende do equilíbrio metabólico entre distintos grupos tróficos de bactérias e arqueias. Os resultados reportados na literatura especializada, não são conclusivos em relação ao efeito das variações de carga orgânica volumétrica (COV) aplicada a digestão anaeróbia de resíduos alimentares, sobre a comunidade microbiana.
- ii. Digestores anaeróbios de resíduos alimentares operados com variações de COV aplicadas, afetam diretamente a composição e a estrutura da comunidade microbiana.
- iii. A adição de elementos traço em sistemas anaeróbios de resíduos favorece o desenvolvimento e a manutenção da complexa comunidade microbiana, principalmente as arqueias metanogênicas, e, conseqüentemente, maior produção de metano e melhorias no desempenho do digestor. Entretanto, uma diversidade de elementos traço são testados de forma aleatória, a maior parte dos estudos (BANKS *et al.*, 2012; QIANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; FACCHIN *et al.*, 2013; YRONG *et al.*, 2015), indicam que cobalto, ferro, níquel, molibdênio e outros, são elementos fundamentais para o desenvolvimento celular. Existem poucos estudos que combinam diferentes elementos traço com diferentes concentrações, principalmente para tratar resíduo alimentar. Todavia, a literatura não é conclusiva em relação aos principais elementos traço, as combinações e as concentrações mais importantes que poderiam ser adotadas no processo.

### 4.2 HIPÓTESES

- i. Em digestores anaeróbios de resíduos alimentares com elevadas variações de COV, predominam arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, e em sistemas submetidos a baixas variações de COV, predominam arqueias acetotróficas, uma vez que estas são mais sensíveis às variações de pH do meio e, portanto, ao acúmulo de AGV. Para avaliar esta hipótese, um digestor anaeróbio em escala de demonstração foi operado e monitorado sob condições de cargas orgânicas variáveis: fase I, de 1,2 a 1,7; fase II, de 1,0 a 2,4; e fase III, de 1,2 a 1,7 kgSV.m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>, esta última com pré acidificação do afluente.
- ii. A disponibilidade de combinações de elementos traço é requerida diretamente pela comunidade microbiana. As combinações de Co [1,0 e 10 mg/L], Fe [5,0 e 50 mg/L] e Ni [0,5 e 5,0 mg/L] favorece o desempenho da comunidade microbiana e, conseqüentemente, aumenta a eficiência do processo. As combinações de Mo [0,5 e 5,0 mg/L], Fe [5,0 e 50 mg/L] e Ni [0,5 e 5,0 mg/L] são requeridos pela comunidade microbiana, com aumento no

desenvolvimento dos micro-organismos, favorecendo de forma acelerada na performance e eficiência do processo anaeróbio, contribuindo com maior incremento na produção de metano. Para avaliar esta hipótese vários ensaios em reatores batelada (de 0,6 L) foram realizados com a adição dos elementos traço (cobalto, ferro, níquel e molibdênio), em separado e em mistura, em diferentes concentrações, e o potencial de produção de metano, a partir do resíduo alimentar foi determinado (estes resultados são apresentados no item 7.3).

### **4.3 OBJETIVOS**

#### ***Geral***

Investigar a comunidade microbiana de digestor anaeróbio de resíduo alimentar e verificar o efeito das cargas orgânicas aplicadas e da adição de elementos traço sobre a composição da comunidade microbiana.

#### ***Específicos***

- i. Determinar a composição e estrutura da comunidade microbiana de um digestor anaeróbio de resíduo alimentar escala demonstração, submetido à variação de carga orgânica volumétrica (COV).
- ii. Avaliar o efeito da adição de elementos traço sobre o potencial de produção de metano e a implicação na diversidade e composição da comunidade microbiana de reatores em escala de laboratório tratando resíduo alimentar.

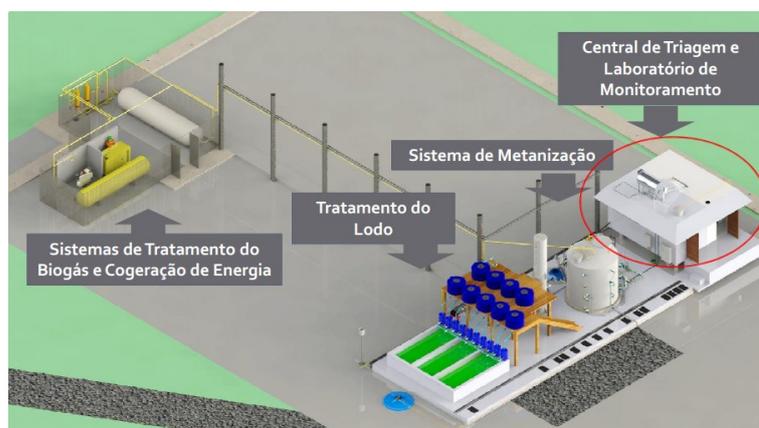
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Primeira Etapa – Reator Escala Demonstração

#### 5.1.1 Tratamento de Resíduo Alimentar em Planta de metanização (pMethar)

A primeira etapa do estudo foi realizada na Plataforma de Metanização de Resíduos Orgânicos (pMethar) instalada no Campus Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Os resíduos orgânicos foram coletados do restaurante universitário setorial 1 do Campus Pampulha, Belo Horizonte-MG. No próprio restaurante ocorre a segregação da fração orgânica. O sistema que recebe os resíduos orgânicos é constituído de uma unidade de triagem e trituração, um tanque de alimentação de substrato, um reator de metanização, um tanque de extração do material digerido, uma unidade de separação sólido-líquido, um sistema de condicionamento e de acumulação de biogás, um sistema de cogeração de energia e calor, a partir do biogás (Figura 5-1).



Fonte: Methanum

**Figura 5-1.** Plataforma de metanização de resíduos orgânicos (pMethar)

#### 5.1.2 Operação do Reator de Metanização pMethar

O aparato experimental é constituído de polímero reforçado com fibra de vidro (PRFV), com altura útil de 2,65 m, volume útil de 18,8 m<sup>3</sup> e diâmetro nominal de 3,00 m (Figura 5-2). O reator de metanização foi inoculado com 16 m<sup>3</sup> de lodo anaeróbio mesofílico, proveniente de um reator UASB em escala plena, tratando esgoto doméstico e 2,5 m<sup>3</sup> de rúmen bovino proveniente de um abatedouro. Os inóculos foram adicionados no reator e a comunidade microbiana foi aclimatada por 50 dias antes do start-up. O reator de metanização foi operado

em um único estágio de digestão anaeróbia, sob a via úmida de tratamento (~5%), mistura completa em batelada com a alimentação de resíduo alimentar triturado e bombeado para o reator. A mistura do sistema foi realizada por recirculação interna da biomassa através de bombeamento. E o aquecimento do sistema realizado pela recirculação de água quente, por meio de uma serpentina instalada na parte interna do reator. A água constantemente, aquecida por um sistema a vácuo de aquecimento solar.



**Figura 5-2. Digestor** escala demonstração localizado na pMethar UFMG

## ***5.2 Segunda Etapa - Potencial Bioquímico de Metano (BMP)***

### ***5.2.1 Experimentos com Adição de Elementos Traço em Reatores em Batelada***

Para a obtenção do incremento de metano, a partir do resíduo alimentar, com e sem adição de elementos traço, foram realizados testes no equipamento ‘Sistema Automático para Teste de Potencial de Metano - AMPTS II’. Os testes consistiram em diferentes relações substrato/inóculo (com e sem adição de elementos traço), bem como foram testadas distintas concentrações de elementos traço, em separado e em combinação (conforme Quadro 5-1 abaixo). Todos os testes foram realizados em triplicatas com temperatura mesofílica à 30 °C, contendo um branco (contendo somente o lodo de inóculo sem adição do substrato) e um controle (substrato + inóculo sem adição de elemento traço). Então, cada teste foi constituído por 15 ensaios, ou seja, 15 frascos reatores.

**Quadro 5-1.** Resumo dos ensaios de BMP realizados

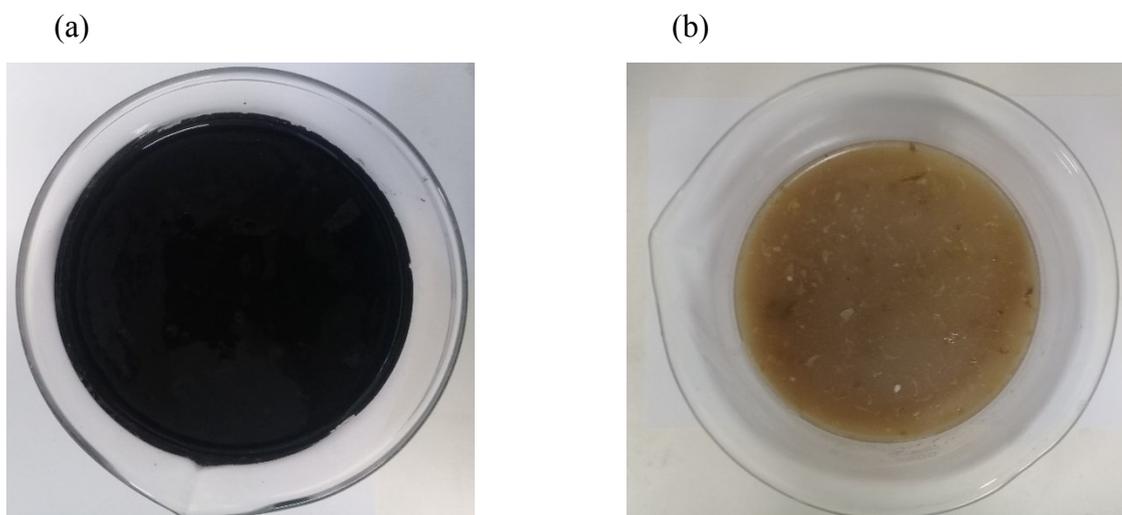
Testes	Objetivo	Razão (S/I)	Adição de elementos traço
1	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de <b>cloreto férrico</b> (5,0; 25,0; 250; 2500 mg/L).	0,5	Sim, em separado
2	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de <b>cloreto de cobalto</b> (1,0; 5,0; 10,0 mg/L)	0,5	Sim, em separado
3	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de <b>molibdato de amônio</b> (0,5;5,0;15,0 e 50,0 mg/L)	0,5	Sim, em separado
4	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de <b>cloreto de níquel</b> (0,5 e 5,0 mg/L)	0,5	Sim, em separado
5	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de metais ( <b>em combinação:</b> cobalto+ ferro+ níquel): Co (1,0 e 10,0 mg/L); Fe (5,0 e 50,0 mg/L); Ni (0,5 e 5,0 mg/L)	0,5	Sim, em combinação de 3 metais
6	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de metais ( <b>em combinação:</b> cobalto, ferro e níquel): Co (1,0 e 10,0 mg/L); Fe (5,0 e 50,0 mg/L); Ni (0,5 e 5,0 mg/L)	1,5	Sim, em combinação de 3 metais
7	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de metais ( <b>em combinação:</b> <b>molibdênio+ ferro+níquel</b> ): Mo (0,5 e 5,0 mg/L); Fe (5,0 e 50,0 mg/L); Ni (0,5 e 5,0 mg/L)	0,5	Sim, em combinação de 3 metais
8	- Determinar o incremento de metano, a partir da adição de diferentes concentrações de metais ( <b>em combinação:</b> <b>molibdênio+ ferro+níquel</b> ): Mo (0,5 e 5,0 mg/L); Fe (5,0 e 50,0 mg/L); Ni (0,5 e 5,0 mg/L)	1,5	Sim em combinação de 3 metais

Os ensaios com diferentes razões substrato/inóculo (S/I) foram preparados com base no teor de sólidos voláteis (SV) do substrato (resíduo alimentar) e do inóculo (lodo do digestor anaeróbio da pMethar). Após as análises de sólidos das matrizes de inóculo e substrato foram realizados os cálculos para o alcance das razões S/I desejadas. As quantidades incubadas de inóculo (lodo) e resíduo alimentar foram determinadas conforme descrito a seguir:

- Primeiramente efetuou-se os cálculos para o inóculo do lodo anaeróbio, que devido à menor concentração de SV, resultou em maior volume de material em relação ao substrato;
- A massa da mistura lodo anaeróbio + substrato (resíduo) foi determinada de forma arbitrária, e as massas do inóculo e do resíduo foram calculadas mantendo-se as relações substrato/inóculo de 0,4 a 0,5 e 1,4 e 1,5 gSVsubstrato.gSVinóculo);

- A razão entre a massa e SV em  $\text{g.mL}^{-1}$  de cada material (substrato ou inóculo) resultou no volume de cada um a ser adicionado nos frascos;
- Com o volume e massa de substrato (resíduos) fixados, pode-se calcular a massa e o volume de inóculo, mantendo-se as relações substrato/inóculo definidas.

Realizados os cálculos, os volumes estabelecidos para o substrato e o inóculo, estes foram adicionados nos frascos reatores (Figura 5-3). Para cada frasco reator foi utilizado um volume de trabalho fixo de 400 mL com 200 mL de *head space*. Quando necessário adicionava-se os volumes de elementos traço. Após mistura de todos os ‘elemento’ (inóculo, resíduo alimentar e/ou metais), media-se o pH inicial em todas as amostras, e quando necessário eram feitas as correções com solução tampão de cal hidratada (CaO) com ajuste a 7,2. Os frascos eram fechados e fluxionados com nitrogênio por 2 minutos, para lavagem do ambiente e manutenção da anaerobiose.



**Figura 5-3.** Amostras de lodo/inóculo (a) e de substrato/resíduo alimentar (b)

A determinação de metano foi realizada de forma online pelo software Bioprocess control inserido no equipamento AMPTS II. Os resultados podem ser obtidos por quarto de hora, hora e a cada vinte e quatro horas, no qual é necessário o procedimento de baixá-los no formato de planilha (xls). Após a observação na estabilização de produção de metano, o teste era finalizado e, em cada frasco reator medidos o pH final. As amostras após estabilização foram preparadas e congeladas para posterior análise. Esta etapa distribuiu-se em três fases:

**1) Inóculo Digestor pMethar:** lodo da estação de tratamento ETE Onça usado como inóculo no digestor da plataforma de metanização para o tratamento de resíduo alimentar, se tornando um inóculo diferenciado, ou seja, com distinta característica.

## 2) Testes com diferentes relações substrato/ inóculo (S/I)

A relação de substrato/inóculo adotada foi de 0,4 a 0,5, segundo recomendações de Angelidaki *et al.*, 2009; e S/I de 1,4 a 1,5 conforme, Chynoweth *et al.* (1993) que relataram rendimentos máximos de metano com razões S/I de 0,5 a 1,0 na digestão anaeróbia em batelada com matéria-prima de herbácea lenhosa e resíduos orgânicos municipais. E Hashimoto (1989) quando descobriu que os rendimentos de metano foram menores nas razões S/I superiores a 4,0 em um estudo sobre a influência da relação S/I no incremento de CH<sub>4</sub> em palha de trigo, utilizando 20 diferentes razões de S/I entre 0,03 a 10,91. Os testes com diferentes razões S/I estão descritos nas tabelas no apêndice.

## 3) Testes com diferentes concentrações de metais e diferentes relações substrato/ inóculo (S/I)

Para a realização dos testes com as combinações dos elementos traço foram feitas soluções concentradas dos elementos específicos para CoCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, NiCl<sub>2</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo. As soluções foram preparadas com elevadas concentrações dos elementos em decorrência da reduzida massa para pesagem, para minimização da margem de erros (Tabela 5-1). Os elementos eram pesados em balança analítica de precisão (Ay 220, Marte; 110 v). Posteriormente, a massa pesa de cada elemento foi adicionada em balões volumétricos de vidro, diluídas com adição de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, 110 v) e homogeneizadas em agitador magnético (Oberflachen Temp Heizplate, Ikamag RCT, 110 v). Previamente ao preparo das soluções, realizava-se os cálculos para as concentrações das soluções e o volume desejado. Na tabela 5-2 indica as concentrações selecionadas dos elementos traço e os volumes necessários para as referidas concentrações. Na tabela 5-3 está exposto de forma resumida as concentrações dos elementos traço, bem como as combinações e as razões S/I utilizadas.

**Tabela 5-1.** Soluções concentradas dos elementos traço

Soluções de Metais			
<b>Cloreto de Cobalto (CoCl<sub>2</sub>)</b>	<b>Cloreto Férrico (FeCl<sub>3</sub>)</b>	<b>Cloreto de Níquel (NiCl<sub>2</sub>)</b>	<b>Molibato de Amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo</b>
Solução [100 mg/L]	Solução [1000 mg/L]	Solução [50 mg/L]	Solução de [100 mg/L]
0,4034 g de CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O em 1L de H <sub>2</sub> O	0,0048 g de FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O em 1L de H <sub>2</sub> O	0,2016 g de NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,0128 g de (NH <sub>4</sub> ) 6Mo7O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O

**Tabela 5-2.** Concentrações de elementos traço e respectivos volumes adicionados nos testes

Concentrações de Metais e Volumes Adicionados							
CoCl <sub>2</sub> (mg/L)	Volume Adicionado (mL)	FeCl <sub>3</sub> (mg/L)	Volume Adicionado (mL)	NiCl <sub>2</sub> (mg/L)	Volume Adicionado (mL)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo (mg/L)	Volume Adicionado (mL)
[1,0]	4	[5,0]	2	[0,25]	2	[0,5]	2
[5,0]	20	[25]	10	[0,5]	4	[5,0]	20
[10]	40	[50]	20	[1,0]	8	[15]	60
-	-	[250]*	10*	[5,0]	40	[50]	200
-	-	[2500]*	100*	-	-	-	-

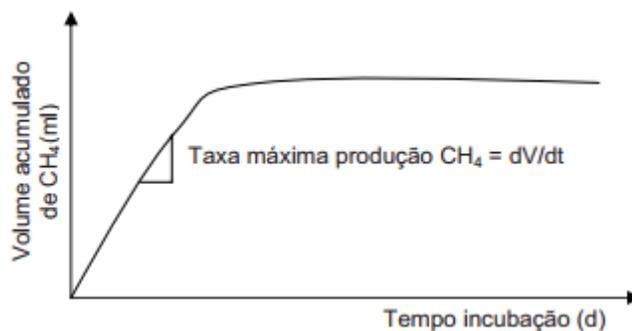
\*Os cálculos das concentrações [250 mg/L e 2500 mg/L] foram realizadas a parte para uma concentração final de [2500 mg/L].

**Tabela 5-3.** Ensaios com diferentes combinações e concentrações de metais adicionados nos reatores

Teste	Ensaios	Combinação dos metais	S/I	S/I
7 e 8	A	CoCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	0,48	1,47
7 e 8	B	CoCl <sub>2</sub> [10 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50 mg/L] e NiCl <sub>3</sub> [0,5 mg/L]	0,48	1,47
7 e 8	C	CoCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]	0,48	1,47
7 e 8	D	CoCl <sub>2</sub> [10 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	0,48	1,47
9 e 10	A	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [0,5 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	0,5	1,49
9 e 10	B	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [5,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	0,5	1,49
9 e 10	C	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [0,5 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]	0,5	1,49
9 e 10	D	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [5,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	0,5	1,49

### 5.3 Cálculo Taxa Máxima de Produção do Metano

A partir dos dados gerados em volume acumulado de metano pelo software Bioprocess Control em planilhas semelhantes ao excel, foram obtidos os cálculos da taxa máxima de produção de metano. Para tal, considerou-se os dados de produção de metano ao longo do tempo (dia), para obtenção do coeficiente angular da reta e traçada no período de máxima produção. O valor da taxa máxima existente em cada frasco foi expresso em mL/d (Figura 5-4). Os testes eram finalizados quando a produção acumulada de metano estabilizava, ou seja, quando a taxa máxima de produção de metano (ponto máximo de inclinação na curva obtido em gráfico tipo volume acumulado de metano versus tempo de incubação) era alcançada antes que o teste fosse encerrado (AQUINO *et al.*, 2007).



Fonte: Aquino *et al.* (2007)

**Figura 5-4.** Determinação gráfica da taxa máxima de produção de metano

#### 5.4 Cálculo Rendimento de Metano

O rendimento de metano foi obtido a partir da quantidade de substrato orgânico adicionado no reator. O volume acumulado do experimento dividido pela quantidade de material de substrato orgânico adicionado no reator. Assim, no frasco de amostra experimental, também haverá resíduos orgânicos presentes no inóculo adicionado, que produzirá certa quantidade de biogás no processo anaeróbio, e sua fração volumétrica de biometano deve ser subtraída do volume acumulado total de biometano para obter a verdadeira produção a partir do substrato. Assim, o rendimento de CH<sub>4</sub> pode ser expresso de acordo com a equação 1:

$$\text{Rendimento de CH}_4 = \frac{\bar{X} \text{ vol, acumulado CH}_4 \text{ amostra} - \bar{X} \text{ vol, acumulado CH}_4 \text{ branco}}{SV \text{ substrato}}$$

Equação 1

As amostras referentes ao branco (somente lodo) gerarão apenas a quantidade de biometano a partir do inóculo e podem continuar a ser normalizadas para a produção de biometano por unidade de peso de material orgânico seco no inóculo. A fração obtida deve ser multiplicada com a quantidade de material orgânico seco do inoculum em cada frasco de amostra, a fim de calcular a quantidade de biometano proveniente do inóculo no reator da amostra.

Conforme observado na equação, a relação entre a quantidade de material orgânico do inóculo na amostra versus ao branco é igual à relação entre a quantidade total do inóculo na amostra e no branco.

Realizados os cálculos os volumes estabelecidos para o substrato e o inóculo, estes eram adicionados nos frascos reatores (Figura 5-3). Para cada frasco reator foi utilizado um volume de trabalho de 400 mL com 200 mL de *head space*. E quando pertinente, fazia-se a adição dos volumes com as concentrações adotadas de elementos traço (Tabela 5-2). O pH inicial foi medido em todas as amostras, e quando necessárias feitas correções com solução tampão de

cal hidrata (CaO) com ajuste a 7,2. Os frascos foram fechados e fluxionados com nitrogênio para lavagem do ambiente para manutenção anaeróbia da atmosfera. Os ensaios eram incubados em triplicatas de mistura completa.

### 5.5 Métodos de Caracterização da Comunidade Microbiana

A caracterização da comunidade microbiana na etapa 1 e 2 foram realizadas por métodos de sequenciamento massivo, conforme quadro 5-2.

**Quadro 5-2.** Resumo das amostras sequenciadas nas etapas 1 e 2

	<b>Amostras Digestor</b>	<b>Técnicas</b>
<b>Etapa 1</b>	Lodo de UASB Rúmen bovino Fase II - dia 146 Fase II - dia 220 Após fase III - dia 287	Extração de DNA Sequenciamento MiSeq/Illumina
	<b>Amostras Testes AMPTS</b>	<b>Técnicas</b>
<b>Etapa 2</b>	Teste 1: FeCl <sub>3</sub> (S/I 0,5) Teste 2: CoCl <sub>2</sub> (S/I 0,5) Teste 3: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo (S/I 0,5) Teste 4: NiCl <sub>2</sub> (S/I 0,5) Teste 5: CoCl <sub>2</sub> + FeCl <sub>3</sub> + NiCl <sub>2</sub> (S/I 0,5) Teste 6: CoCl <sub>2</sub> + FeCl <sub>3</sub> + NiCl <sub>2</sub> (S/I 1,5) Teste 7: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo + FeCl <sub>3</sub> + NiCl <sub>2</sub> (S/I 0,5) Teste 8: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo + FeCl <sub>3</sub> + NiCl <sub>2</sub> (S/I 1,5)	Extração de DNA Sequenciamento Ion Torrent/Life

Nota: Sequenciamento Ion Torrent somente testes 5 e 6.

#### 5.5.1 Extração de DNA

As amostras de biomassa coletadas foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos e lavadas por três vezes sucessivas com tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,2-7,4). As amostras foram alicotadas, pesadas e armazenadas a -20C°. Posteriormente, o DNA genômico foi extraído a partir de 0,5 g de todas as amostras com o kit de extração PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, E. U. A.), de acordo com as instruções do fabricante. Para a verificação do resultado da extração, alíquotas de 2,0µl do DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0% (75 volts, 35 minutos). O GeneRuler Express DNA Ladder (100-5000 pb, Thermo Scientific) foi utilizado como marcador de peso molecular. Após a eletroforese o gel foi observado em transluminador de luz UV e as imagens obtidas por um sistema de captura de imagens. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e no Qubit (Life Technologies).

### 5.5.2 Sequenciamento Massivo de Nova Geração - Metagenômica

O sequenciamento de DNA de nova geração – SNG, do inglês, Next Generation Sequencing (NGS), são processos de sequenciamento que permitem o processamento massivo de fragmentos de DNA, possibilitando a leitura de milhares de fragmentos ao mesmo tempo. Devido ao alto rendimento do sequenciamento, as plataformas de sequenciamento estão em constante aperfeiçoamento e evolução, tendo sido adaptadas para aplicações em larga escala, e também na busca pela redução dos custos (LOMAN *et al.*, 2012).

O SNG produz milhões de sequências curtas, que podem variar em dezenas de pares de base (pb) a por exemplo, 800 pb (LUO *et al.*, 2012). Segundo DELFORNO (2014), a utilização do sequenciamento massivo para estudos de diversidade microbiana apresenta bons resultados quando parâmetros como tamanho do fragmento, cobertura da amostragem (rendimento da corrida), acurácia (precisão na medição) e custos são avaliados. A plataforma MiSeq é a que apresenta maior cobertura, entretanto, os fragmentos são menores, comparado ao Ion Torrent (Tabela 5-4).

**Tabela 5-4.** Comparação e especificações das plataformas

Plataformas	MiSeq/Illumina	Ion Torrent/Life Technology
Rendimento de sequência por corrida	1,5 a 2,0 Gb	20 a 50 Mb com chip 314; 100 a 200 Mb com chip 316; 1 Gb com chip 318
Tempo de corrida	27 horas	2 horas
Acuracia reportada	>Q30	Q20
Taxa de erro observada	0,80%	1,71%
Comprimento de leitura	até 150 bases	~200 bases
Leituras emparelhadas	sim	Sim
Tamanho inserido	até 700 bases	até 250 bases
Requerimento de DNA típico	50 a 1000 ng	100 a 1000 ng

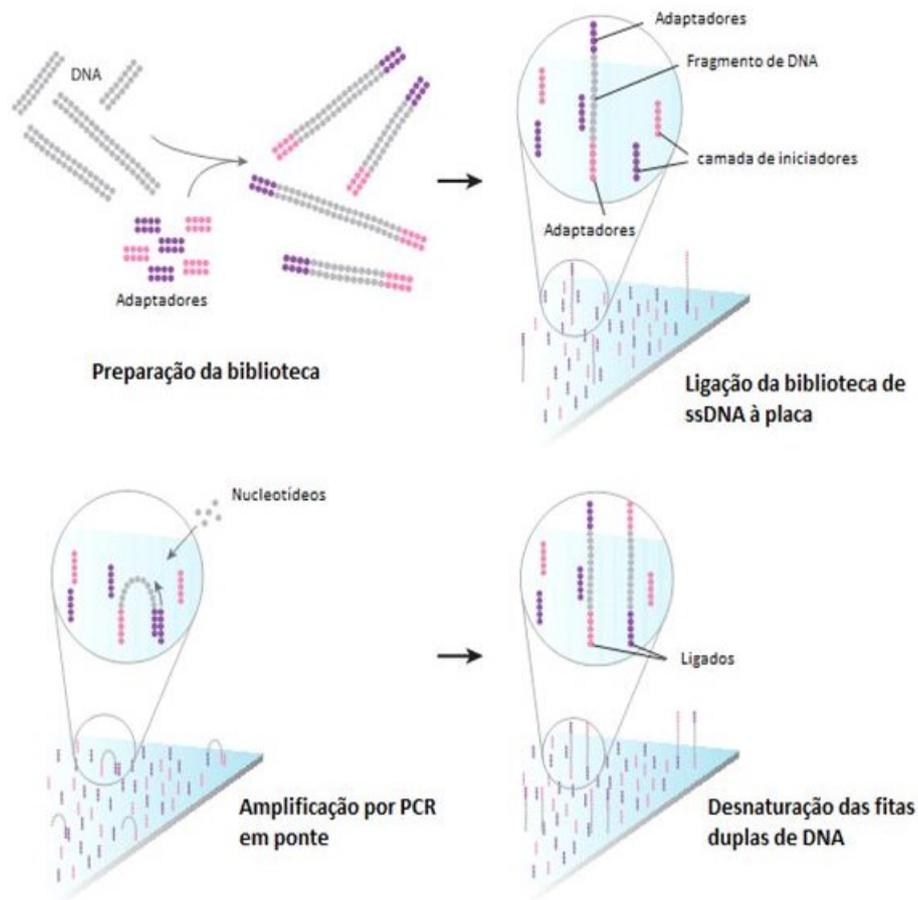
O tamanho do fragmento pode afetar o estudo filogenético e limitar a identificação dos microorganismos em níveis taxonômicos (LIU *et al.*, 2012; DELFORNO, 2014). Uma vez que não é possível o sequenciamento completo do gene RNAr 16S através do sequenciamento massivo, é necessário a escolha de regiões desse gene, que apresenta 9 regiões variáveis, V1-a V9 (NEEFS *et al.*, 1993). De acordo com LIU *et al.* (2007), citado por DELFORNO (2014), a região do 16S a ser estudada deve ser cuidadosamente selecionada para que permita a identificação taxonômica e estudo da comunidade microbiana presente em um ambiente. As

principais regiões utilizadas para estudos filogenéticos do 16S são a V2 e V4 (LIU et al., 2007).

#### 5.5.2.1 Plataforma MiSeq/Illumina

O método de sequenciamento químico da plataforma MiSeq (empresa Illumina) é denominado sequenciamento por síntese. No lugar de se colocar o DNA em um gel, o sequenciamento por síntese, requer que o DNA seja colocado em uma superfície dentro de uma célula de fluxo. O instrumento MiSeq adiciona as bases e adquire a imagem de cada ciclo. Um ciclo consiste na adição e na leitura de cada base. Os pontos coloridos para cada ciclo formam os grupos que são compostos de sequências curtas, ou seja, pequenas regiões do fragmento de DNA amplificado (LOMAN *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2012). As informações abaixo foram extraídas do site da empresa Illumina e descrevem o método realizado pela plataforma MiSeq.

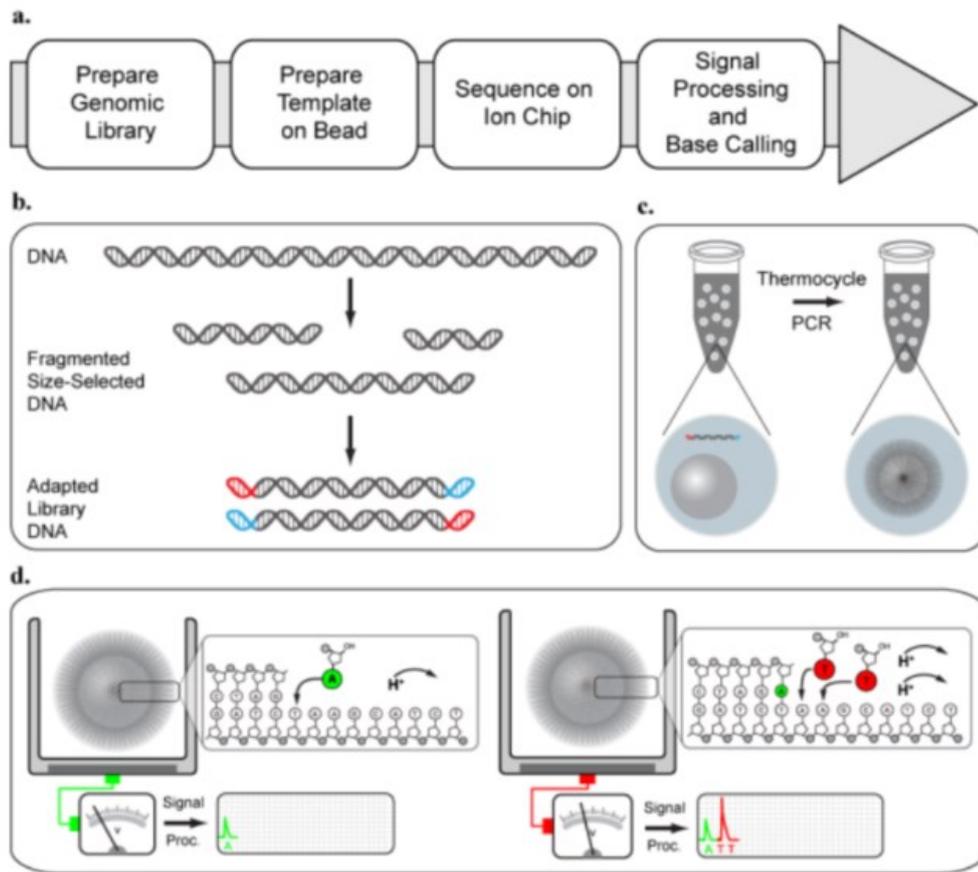
O sequenciamento químico da plataforma MiSeq pode ser dividido em duas partes: A primeira parte consiste na preparação da amostra, onde as moléculas de DNA de fita simples são aderidas aos adaptadores (pequenos fragmentos sintetizados de DNA). Logo em seguida, as amostras são colocadas na célula de fluxo do sistema MiSeq. A célula de fluxo é coberta com oligonucleotídeos complementares, o qual permite a adesão das amostras à célula de fluxo. Dessa forma, as amostras de DNA se ligam aos oligonucleotídeos complementares na superfície da célula de fluxo numa etapa conhecida como hibridação. Após a hibridação, o MiSeq amplifica muitas cópias do modelo de DNA hibridado na célula de fluxo. Posteriormente, dá-se o alinhamento dos primers. Os primers do sequenciamento são adicionados (pequenos fragmentos de DNA complementares à sequência dos adaptadores) e logo após, os nucleotídeos adenina, citosina, timina e guanina, são marcados com corante fluorescente diferente (Figura 5-5). Somente um nucleotídeo é adicionado por vez, permitindo a detecção da fluorescência. A detecção de uma base, mediante a fluorescência, significa que a cadeia de DNA tem o par de bases complementares nessa posição (por exemplo, se uma citosina é detectada, sabe-se que a cadeia de DNA da amostra tem uma guanina nessa posição). Após a incorporação da primeira base, adiciona-se mais nucleotídeos marcados e, em continuidade procede-se a leitura da sequência do DNA alvo. Ao final do processo, às sequências lidas são alinhadas com um genoma de referência presente em uma biblioteca. O alinhamento possibilita a determinação da localização do DNA no genoma. Os resultados finais podem ser visualizados na plataforma MiSeq.



**Figura 5-5.** Sequenciamento MiSeq/Illumina

### 5.5.2.2 Plataforma Ion Torrent/Thermo Fisher Scientific

O método Ion Torrent utiliza uma saída de hidrogênio para ligação do nucleotídeo. A fragmentação do DNA junto com os adaptadores se ligam as beads em PCR emulsão (Figura 5-6). Cada bead entra em uma única gotícula para cada poço e dentro ocorre a amplificação. Todos os pocinhos passam pelo processo de forma simultânea. No Ion Torrent ocorre diferença de potencial elétrico para liberação de próton ( $H^+$ ). Todas as vezes que ocorre essa liberação é registrado no chip (318).



**Figura 5-6.** Sequenciamento Ion Torrent/Thermo Fisher Scientific

## 6 ANÁLISE METANOGÊNICA E PERFORMANCE DE REATOR ANAERÓBIO MESOFÍLICO TRATANDO RESÍDUO ALIMENTAR EM VÁRIAS TAXAS DE CARREGAMENTO

Os resultados deste capítulo foram publicados em: *Environmental Technology* **JCR**, v. 38, p. 1-11, 2016.

### *Objetivo Específico 1*

#### **6.1 Resumo**

O desempenho de um digestor anaeróbio em escala de demonstração tratando resíduo alimentar foi avaliado, com ênfase na resposta microbiana com o aumento das taxas de carga orgânica (COVs). O digestor exibiu um desempenho estável em termos de rendimento de metano com COV variando de 1,0 a 2,4 kg SV L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (fases I e II), comparado com 1,0-1,5 kg SV L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (a fase III), quando o resíduo alimentar apresentou maior acidez. A análise de sequenciamento de nova geração, revelou mudanças na composição microbiana em cada fase operacional. Os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram favorecidos, enquanto a abundância de *Proteobactérias* e *Chloroflexi* diminuíram com maiores COV, indicando que as bactérias fermentativas, e hidrolíticas (e acidogênicas) foram selecionadas sob esta condição. Mudanças foram observadas na composição das metanogênicas, e não na abundância, em resposta a alteração da COV. *Methanosaeta* e *Methanospirillum* dominaram com COV baixa, indicando a importância de ambas as metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, para a produção de metano durante esta condição. *Methanosaeta* quase desapareceu com elevada COV, enquanto *Methanoculleus* foi favorecida. Os procariotos sintróficos apresentaram elevada abundância (> 9%), indicando importantes neste digestor na produção de metano. As interações síntróficas entre o produtor de hidrogênio (*Syntrophomonas* e *Desulfosporosinus*) e as metanogênicas hidrogenotróficas foram evidentes com elevada COV. Esses resultados indicam que a metanogênese hidrogenotrófica contribuiu significativamente para a produção de metano com COV elevadas, comparado com baixa COV no digestor.

**Palavras-chave:** metano, arqueias, bactérias, carga orgânica, sequenciamento massivo.

#### **6.2 Abstract**

The performance of a demonstration-scale anaerobic digester treating food waste was evaluated with an emphasis on microbial response to increasing organic loading rates (OLRs). The digester exhibited a stable performance in terms of methane yield at OLR ranging from

1,0 to 2,4 kg VS L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (phases I and II), compared to that at phase III (OLR: 1,0–1,5 kg VS L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) when the food waste exhibited greater acidity. Deep sequencing analysis revealed shifts in the microbial composition at each operational phase. The phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were favoured, whereas the abundance of *Proteobacteria* and *Chloroflexi* decreased at higher OLRs, indicating that fermenting, hydrolytic (and acidogenic) bacteria were selected under this condition. Changes were observed in the composition of methanogens, and not the abundance, in response to a shift in OLR. *Methanosaeta* and *Methanospirillum* dominated at low OLRs, indicating the importance of both acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens for methane production during this condition. *Methanosaeta* almost disappeared at high OLRs, whereas *Methanoculleus* was favoured. Syntrophic prokaryotes were in high abundance (>9%), indicating that syntrophic methane production was important in this digester. Syntrophic interactions between hydrogen-producer (*Syntrophomonas* and *Desulfosporosinus*) and hydrogenotrophic methanogens were more evident at high OLR. These results indicate that hydrogenotrophic methanogenesis contributed significantly to methane production at higher OLRs than when the digester was operated at low OLR.

**Keywords:** methane, archaea, bacteria, organic load, massive sequencing,

### 6.3 Introdução

O tratamento e a eliminação de resíduos sólidos urbanos (RSU) tem sido um desafio devido a sua variada composição. O desperdício de alimentos, importante fração de RSU, tem sido uma favorável fonte de matéria-prima para a produção de energia renovável, como o biogás. Vários processos de digestão anaeróbica (DA), como mesofílicos e termofílicos foram desenvolvidos para tratar resíduo alimentar (FORSTER-CARNEIRO *et al.*, 2007; NAGÃO *et al.*, 2012). O resíduo alimentar, geralmente contém maior proporção de matéria orgânica biodegradável, sob a forma de proteínas, carboidratos e lipídios ou gorduras.

DA de resíduo alimentar apresenta elevada carga orgânica (CO), predispondo a falhas devido ao acúmulo de vários ácidos intermediários inibitórios, como ácidos orgânicos voláteis e elevadas concentrações amônia (FORSTER-CARNEIRO *et al.*, 2007). Um dos problemas operacionais comum em reatores anaeróbios escala de demonstração, é o acúmulo de ácidos orgânicos que ocorre, principalmente, durante o start-up. Período em que a comunidade microbiana permanece vulnerável, a mudanças na pressão parcial de hidrogênio, ou em eventos de sobrecarga orgânica. O acúmulo de ácidos inibe a atividade das metanogênicas,

assim induzindo a um desequilíbrio do processo ou a completa falha do processo anaeróbio (DE VRIEZE *et al.*, 2012). Portanto, o digestor deve ser monitorado e vários ácidos metabólicos devem ser investigados para detectar a instabilidade do processo, durante os estágios iniciais. Além disso, a composição e o comportamento da comunidade microbiana devem ser investigadas em relação aos problemas de sobrecarga orgânica, e acúmulo de ácidos em digestores escala real de mistura completa, a fim de aprimorar as condições operacionais, em busca de um perfil adequado de gerenciamento do processo de DA.

Estudos utilizaram tecnologias de sequenciamento de nova geração (SNG/NGS), como o pyrosequenciamento 454 para investigar, a diversidade e a composição microbiana na digestão anaeróbia de diferentes tipos de resíduos (incluindo fração orgânica de RSU) em digestores escala laboratorial e escala real (SUNDBERG *et al.*, 2013; CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2016). Entretanto, informações sobre a dinâmica da comunidade microbiana em DA de resíduo alimentar são escassas.

Em nosso melhor conhecimento, apenas GUO *et al.* (2014) compararam as características microbianas, entre digestores anaeróbios mesofílicos e termofílicos em escala laboratorial. Portanto, no presente estudo, a estrutura da comunidade em digestor escala de demonstração tratando resíduo alimentar foi investigado usando a plataforma MiSeq/Illumina para sequenciamento.

Os objetivos deste estudo foram avaliar o desempenho de um digestor anaeróbio, operado há mais de um ano com aumento da COV e investigar a comunidade microbiana no reator, para elucidar as interações sintróficas na DA de resíduo alimentar e sua relação com as condições operacionais e produção de biogás. Os resultados deste estudo podem ser utilizados para otimizar as condições operacionais e aumentar o conhecimento sobre a dinâmica da comunidade microbiana ocorrida durante a DA de resíduo alimentar.

## **6.4 Material e Métodos**

### **6.4.1 Operação do Reator**

O digestor de 2,65 m de altura, 3,0 m de diâmetro, volume útil de 18,8 m<sup>3</sup>, foi operado sob condições de único estágio, de tratamento úmido com aproximadamente 50 g ST/L<sup>-1</sup>. Dois tipos de inóculos foram adicionados no reator: 16 m<sup>3</sup> de lodo de reator anaeróbio mesofílico (UASB), que trata esgoto doméstico; e 2,5 m<sup>3</sup> de rúmen bovino oriundo de um abatedouro bovino.

Os inóculos foram carregados no reator, e a comunidade microbiana foi aclimatada por um período de 50 dias antes do *start-up*. O resíduo alimentar foi periodicamente coletado do restaurante estudantil da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil).

Os seguintes parâmetros foram medidos durante o período de monitoramento para avaliar o desempenho do reator e detectar acúmulo de ácidos orgânicos, tais como: série de sólidos afluente e efluentes, pH, temperatura (APHA, 2012); e a relação entre a alcalinidade imparcial (AI, relacionada aos ácidos orgânicos) e alcalinidades parcial (AP, equivalente à alcalinidade do bicarbonato) (RIPLEY *et al.*, 1986). As características dos inóculos (lodo UASB e rúmen bovino), resíduo alimentar e amostras do digestor em diferentes fases de operação estão apresentadas na Tabela 6-1. A produção de biogás foi medida usando um gasômetro Itrón G 2,5 (Itrón, Liberty Lakes, WA, EUA); o teor de metano foi analisado utilizando um analisador portátil (GEM 5000, Landtec, Colton, CA, EUA) de tipologias de biogás.

**Tabela 6-1.** Características das amostras dos inóculos (lodo de UASB e rumen bovino), resíduo alimentar e amostras das diferentes fases de operação do digestor

<b>Pârametros</b>	<b>Lodo UASB</b>	<b>Rumen bovino</b>	<b>Resíduo alimentar</b>	<b>Fase II-dia 146</b>	<b>Fase II-dia 220</b>	<b>Antes fase III-dia 287<sup>c</sup></b>
pH	7,02	6,34	3,11 – 6,50	7,27	7,10	7,65
Temperatura (°C)	29,2	28,4	25,2 – 27,1	27,3	25,7	31,7
ST (%)	4,2	2,5	9 - 20	17,2	20,53	-
SV (%)	2,5	1,8	8 - 18	11,3	14,26	-
SV/ST	0,59	0,72	0,92	0,66	0,69	-
Proteínas	0,35 <sup>a</sup>	1,76 <sup>b</sup>	1,86 <sup>b</sup>	0,78 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>	4,76 <sup>a</sup>
Lípidios	0,14 <sup>a</sup>	0,36 <sup>b</sup>	1,2 <sup>b</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	Nd
Carboidratos	nd	1,07 <sup>b</sup>	2,14 <sup>b</sup>	nd	nd	Nd

Nota: valores mínimos e máximos do resíduo alimentar; nd=não detectado; <sup>a</sup>valor expresso em g/100mL; <sup>b</sup>valor expresso em g/100g; <sup>c</sup>as amostras de sólidos não foram realizadas

#### 6.4.2 Análise de Sequenciamento MiSeq

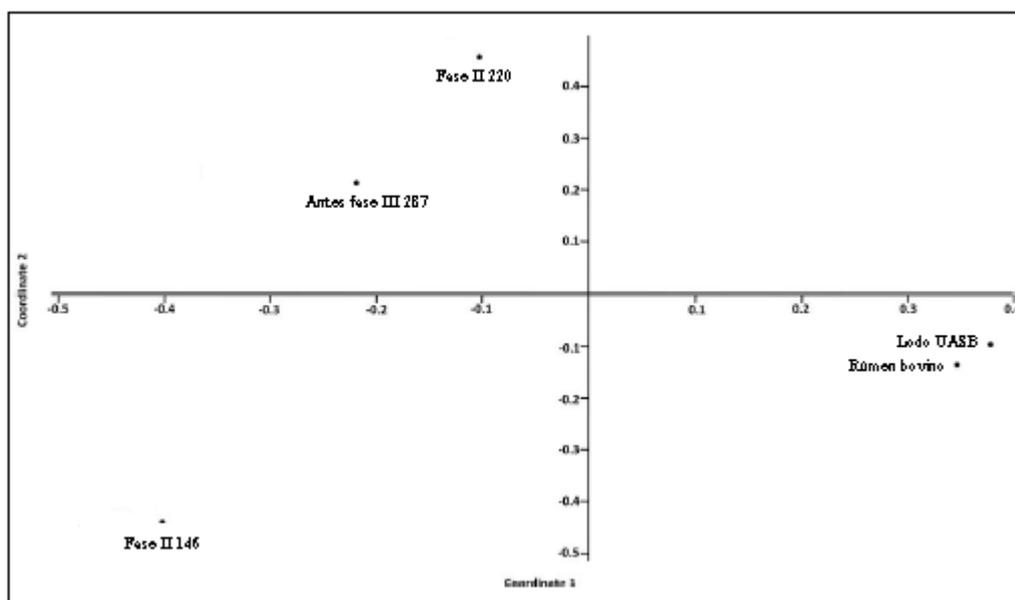
A composição e a estrutura microbiana presente no digestor anaeróbio, foram analisadas utilizando sequenciamento massivo pela Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA). As amostras de inóculo (lodo UASB e rúmen de bovino) e as três amostras do digestor foram recolhidas em diferentes dias de funcionamento do reator: 146 (início da fase II com baixa

TCO de 1,2 a 1,7 kgSV.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), 220 (foram analisados no final da fase II com elevada TCO, variando de 1,0 a 2,4 kgSV.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), e 287 (antes da fase III - período sem alimentação).

A partir de cada amostra, o volume do DNA total foi extraído com o kit de isolamento de ADN PowerSoil® (Mobio Laboratories, EUA) e quantificado (Qubit, Life Technologies). A pureza do DNA foi medida em um espectrofotômetro (Nanodrop 1000, ThermoScientific). As amostras de DNA foram enviadas para MacroGen Inc, para a construção da biblioteca e sequenciamento na plataforma MiSeq (Illumina). Os iniciadores (primers) utilizados na reação de amplificação foram 515F (GTGNCAGCMGCCGCGGTAA) e 926R (CCGYCAATYMTTTRAGTTT), que delimitam as regiões V4 e V5, a maior parte do gene 16S de RNAr para bactérias e arqueias (QUINCE *et al.*, 2011). As sequências foram analisadas no Centro de Bioinformática (CEBIO), Instituto de Pesquisa René Rachou.

A análise de bioinformática foi realizada com o pacote de software QIIME (Introspecções Quantitativa de Ecologia Microbiana) para processar as bibliotecas utilizando uma estratégia de agrupamento ao qual foi adicionado a classificação taxonômica (CAPORASO *et al.*, 2010). Primeiro, as sequências *fastq* foram demultiplexed, os barcodes e os primers foram removidos. A qualidade da média mínima do conjunto de Phred definida foi 20, UCHIME foi utilizado para a correção de erros e verificação de quimeras. A identificação de genes 16S RNAr foi realizada por uma unidade taxonômica operacional (OTU) com nova abordagem de escolha, Sequências foram criadas via UCLUST (identidade de 97%). O pós-processamento das OTUs foram realizada para as sequências mais representativas.

A atribuição taxonômica foi realizada no banco de dados Greengenes (alinhamento de referência core), A sub-amostragem de classificação taxonômica pelo menor ancestral comum foi obtida utilizando MEGAN (HUSON *et al.*, 2007). O índice de Simpson e diversidade de Shannon-Weaver foram calculados. As distâncias entre as amostras foram calculados com base no índice ecológico de *Bray-Curtis*. A análise de coordenadas principais (PcoA) e o agrupamento hierárquico (árvore UPGMA) foram realizadas utilizando a distância de matrizes MEGAN (Figura 6.1). Os dados sequenciados foram depositados no servidor metagenômico RAST (MG-RAST) sob o número de acesso 15595.



**Figura 6.1** - O gráfico de PcoA descreve as diferenças na diversidade microbiana. As duas primeiras coordenadas principais (PC1 e PC2) do índice de similaridade de PcoA de Bray-Curtis são plotadas para cada amostra. A porcentagem de variação nos eixos 1 e 2 explicam respectivamente, 25,98% e 25,61% da distribuição

## 6.5 Resultados e Discussão

### 6.5.1 Desempenho do Reator

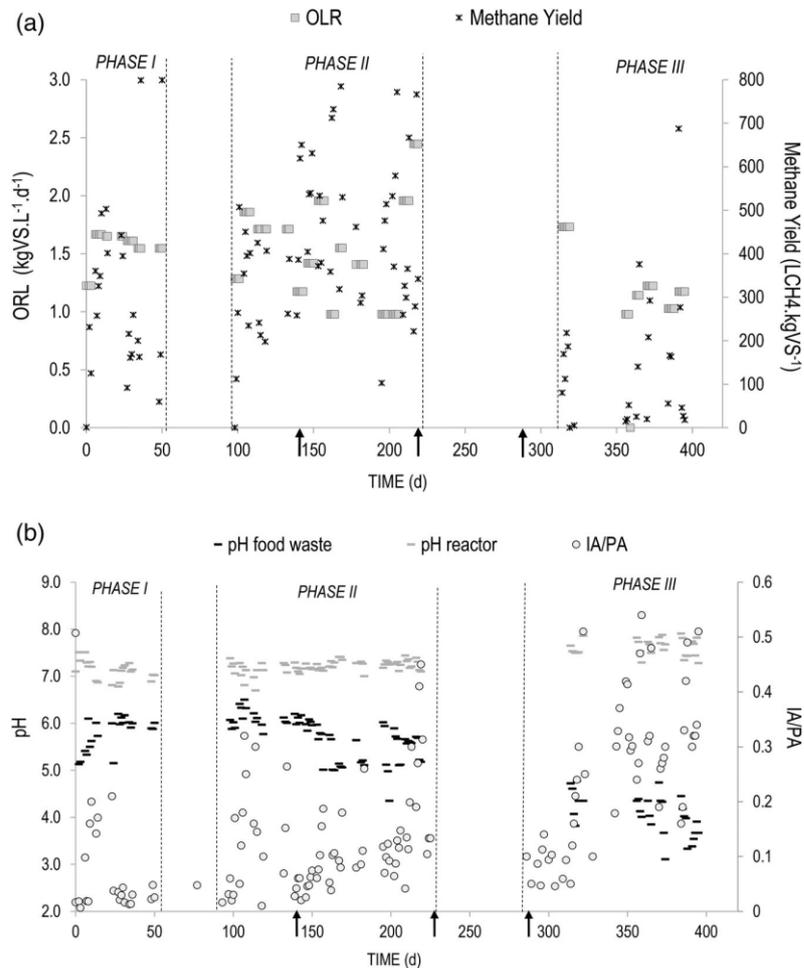
O efeito de diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas no digestor foi determinado em três fases: fase I (51 dias, COV aplicada de 1,2 a 1,7 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>); fase II (período de 121 dias; COV com aumento de 1,0 para 2,4 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), e fase III (período de 81 dias; COV variando de 1,0 a 1,7 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>) (Figura 6-12(a e b)). A COV aplicada durante a fase I (Figura 6-2a) estava em concordância com os valores reportados para digestores anaeróbios de mistura completa (NAGÃO *et al.*, 2012). O rendimento de metano obtido nesta fase variou de 119 a 434 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>.tSV<sup>-1</sup> (Figura 6-2(a)).

O digestor não foi alimentado por 50 dias após a fase I (período de recesso), quando o restaurante universitário entrava em período de recesso. Entretanto, a fase II foi considerada o segundo start-up do digestor. A COV inicial foi de 1,2 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> (aplicada por uma semana) subsequentemente, aumentada para 1,9 e 2,4 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> (Figura 6-2(a)). O rendimento médio de metano variou de acordo com a COV aplicada de 233 a 700 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>.tSV<sup>-1</sup>.

Os primeiros sinais de desequilíbrio no processo, ocorreram com a redução do conteúdo de metano no biogás (<48,5%) e aumento na taxa da AI/AP >0,40, observado com uma COV de  $2,4 \text{ kgSVm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , indicando um desequilíbrio na metanogênese (MARTÍN-GONZÁLEZ *et al.*, 2013). O reator foi submetido a outro período de recesso (sem alimentação), após a fase II.

A fase III, realizada com uma COV inicial de  $1,7 \text{ kgSVm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  (superior aos valores usados durante o período anterior ao start-up), foi considerado como o terceiro start-up do digestor. Nesta fase, o rendimento médio de metano foi de  $150 \text{ m}^3\text{CH}_4 \cdot \text{tSV}^{-1}$  (Figura 6-2(a)) e a diminuição no conteúdo do metano foi observada (34,8%, não mostrado), além do acúmulo de ácidos orgânicos indicado pela relação entre a alcalinidade parcial e imparcial (AI/AP) (0,51) (Figura 6-2(a e b)). O digestor não foi alimentado por um período de 34 dias, para evitar o completo fracasso do processo anaeróbio.

O processo foi então reiniciado com uma COV de  $1,0 \text{ kgSVm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . Apesar disso, o desequilíbrio no sistema foi observado durante a fase III, conforme indicado pela elevada relação AI/AP (0,35 a 0,54) (Figura 6-2 (b)). É importante salientar nesta fase, que o resíduo alimentar, após a trituração foi armazenado em um tanque de alimentação por uma semana, ocasionando na redução do pH do substrato (3,11 a 4,7) (Figura 6-2(b)). Sob estas condições, o tanque de alimentação serviu como unidade de acidificação. Estes resultados sugeriram que o uso de resíduo pré-acidificado se tornou nocivo para o processo anaeróbio, quando comparado a COV inicial aplicada na fase III ( $1,7 \text{ kgSVm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

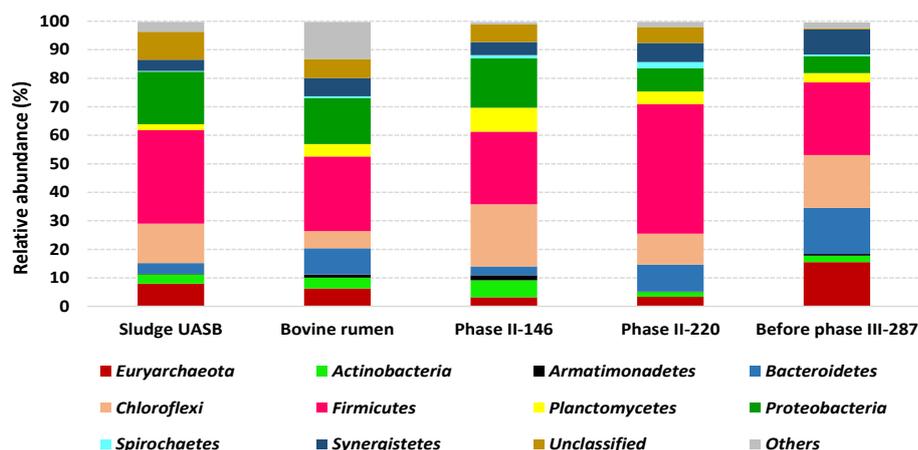


**Figura 6.2** - Perfis de rendimento do metano e da COV durante a operação do reator – (a); perfis da COV e do rendimento de metano, fases I, II e III; (b) perfis do pH do resíduo e da amostra do digestor e IA/AP, fases I, II e III

## 6.5.2 Composição e Diversidade da Comunidade Microbiana Analisada por Sequenciamento Massivo

### 6.5.2.1 Composição Bacteriana

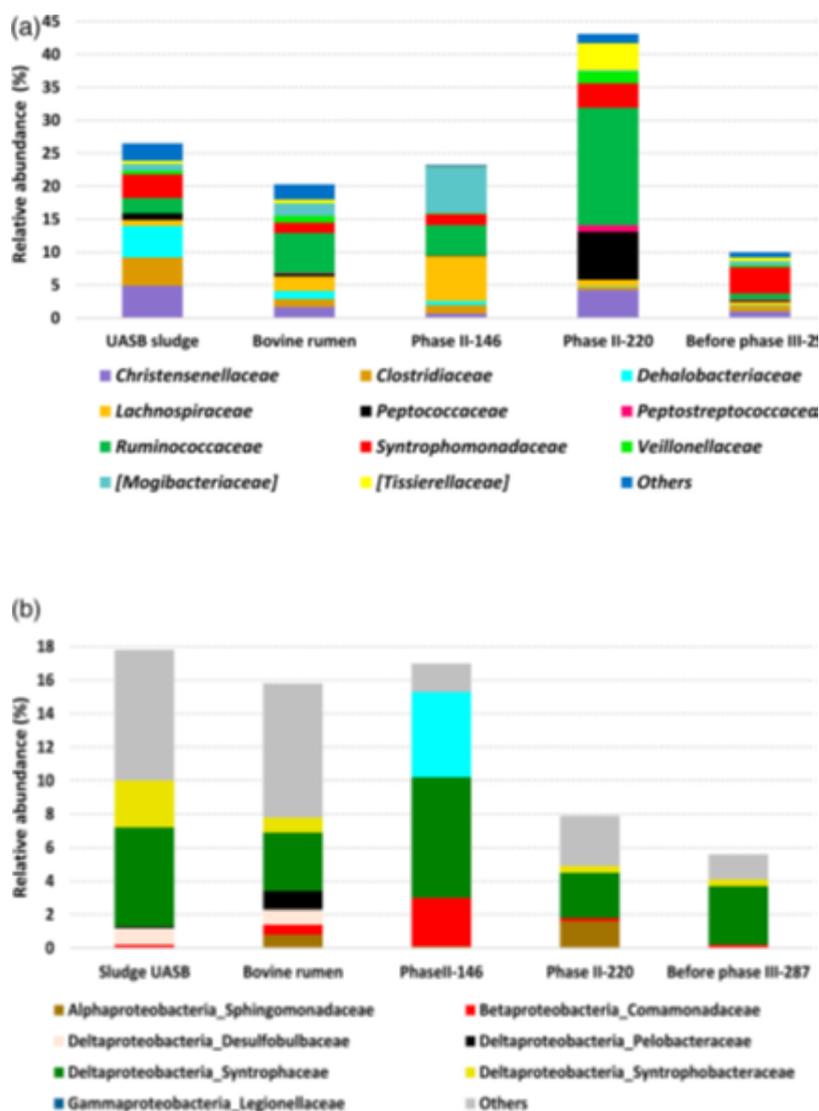
A análise de sequenciamento massivo revelou 10 filos com abundância relativa >1,0% em pelo menos uma amostra. Em nível de filo foram agrupados os micro-organismos abaixo de 1,0% (outros) (Figura 6-3). Os principais filos bacterianos detectados nas amostras dos inóculos e do digestor foram *Firmicutes* (30 a 40%), *Proteobacteria* (10 a 20%), *Chloroflexi* (15,0%), *Bacteroidetes* (8,0%) e *Synergistetes* (7,0%). Juntos, esses cinco filos representam aproximadamente 75,0% da diversidade microbiana, além de terem sido observados em todas as amostras (Figura 6-3). Resultados semelhantes foram relatados por estudos anteriores em reatores e digestores anaeróbios (SUNDBERG *et al.*, 2013; NELSON *et al.*, 2011).



**Figura 6-3.** Comunidade microbiana em nível de filo. Abundância de UTO's <1% (de cada amostra) foi incluída no grupo 'outros'. O número de cada amostra representa o dia coletado, Fase II – dia 146 (baixa COV –  $1,2 \text{ kgSVM}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , fase II – dia 220 (elevada COV –  $2,4 \text{ kgSVM}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) e antes da fase III – dia 287 (período sem alimentação), Lodo de UASB e rúmen bovino foram os inóculos.

Em estudo prévio por CARDINALI-REZENDE *et al.* (2016), digestor operado em escala plena, tratou a fração orgânica de RSU em Madri (Espanha). Neste, foram detectados *Bacteroidetes* e *Firmicutes* que corresponderam a 55,1% e 40,2% (no *start-up*) e 18,7 e 78,7% (na fase estacionária) das sequências totais, respectivamente.

No presente estudo, os filos *Firmicutes*, *Chloroflexi* e *Proteobacteria* foram predominantes no digestor, tanto no início com baixa COV (dia 146, 25%, 20% e 18%, respectivamente) e no estado estacionário com elevada COV (dia 220, 45%, 10% e 7% das respectivas sequências totais). *Bacteroidetes* (10%) foi outro filo importante observado no digestor com elevada COV. A diferença observada nesse estudo em relação ao estudo anterior (CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2016), pode estar atribuída ao tipo de resíduo adicionado no reator, uma vez que a composição da fração orgânica do RSU doméstico, depende do local e da hora de coleta em cada localidade (ALIBARDI *et al.*, 2015). Além disso, o resíduo de cafeterias e restaurantes (fração de resíduo alimentar usada nesse estudo podem ser classificados como resíduos separados na fonte), em geral podem não ser representativo da fração orgânica de resíduo sólido municipal (FORSU) (ZHOU *et al.*, 2013).



**Figura 6-4.** Composição taxonômica de *Firmicutes* (a) e *Proteobacteria* (b) em nível de família de cada sequenciamento pelo MiSeq/ Illumina. Os números das amostras são representados pelo dia de coleta, Fase II dia 146 (baixa COV – 1,2 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), fase II dia 220 (elevada COV – 2,4 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)

Guo *et al.* (2014) tratou resíduo alimentar em reator mesofílico escala laboratorial e reportou a presença de *Bacteroidetes* (40 a 55%), *Firmicutes* (10 a 30%), *Termotogae* (25% a elevada COV) e *Actinobacteria* (10% a elevada COV) durante a operação do reator.

A diferença observada entre o presente estudo e o anterior está atribuída ao tipo de inóculo usado em cada trabalho; no estudo anterior foi aplicado lodo de digestor anaeróbico de tratamento de águas residuárias de suinocultura; enquanto neste estudo, foram aplicados lodo de reator UASB tratando esgoto doméstico e rúmen bovino. Bactérias do filo *Firmicutes* são capazes de fermentar vários substratos orgânicos e formar esporos (LÉVEN *et al.*, 2007).

Entretanto, este filo é predominante em esgoto bruto, e seus membros estão envolvidos na DA de matéria orgânica (MA *et al.*, 2013). Essas bactérias foram abundantes e dominantes em todas as amostras coletadas do digestor, compreendendo 45% no total de sequências com elevada COV (2,4 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> no dia 220, fase II). *Proteobactéria* também foi um filo comum em todas as amostras, com dominância nas amostras dos inóculos e do dia 146 (fase II, baixa COV) (Figura 6-2). Em seguida, *Chloroflexi* esteve presente em todas as amostras, especificamente nas amostras do digestor obtidas com baixa COV (1,3 kg SVm<sup>-3</sup>dia<sup>-1</sup> no dia 146), e antes da fase III (dia 287, período sem alimentação). *Bacterioidetes* e *Synergistetes* foram observadas em todas as amostras, a abundância relativa aumentou nas amostras do digestor nos dias 220 e 287 (Figura 6-3).

Os dados do sequenciamento massivo foram separados em níveis filogenéticos, para explorar a dinâmica de grupos de bactérias dos filios *Firmicutes* e *Proteobacteria* em nível de família (Figura 6-3 (a, b), respectivamente). Dentro do filo *Firmicutes*, 11 famílias estiveram presentes com abundância relativa > 1,0% em uma das amostras. Outras famílias foram agrupadas em um grupo com abundância relativa < 1,0% (Figura 6-3 (a)). *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* e *Syntrophomonadaceae* eram presentes em todas as amostras, com dominância nas amostras dos inóculos de rúmen bovino e no lodo de UASB.

Em geral, elevadas proporções de *Ruminococcaceae* foram observadas em todas as amostras, representando um total de 31,7% das sequências, quando os valores de cada amostra foram somados. Elevada abundância relativa de *Ruminococcaceae* foi observada na amostra do digestor, coletada no dia 220 (17,8%) com elevada COV, comparada com a amostra do digestor coletada no dia 146 (4,6%) (Figura 6-3 (a)). Indicando que houve um enriquecimento dessas bactérias fermentativas, em decorrência do acúmulo e da degradação de complexos substratos. De fato, membros de *Ruminococcaceae* são micro-organismos fermentativos que podem ser tolerantes a condições hiperácidas, e podem usar os ácidos isobutírico, isovalérico e málico para crescimento (DE VOS *et al.*, 2009). Essas bactérias encontradas em sistemas anaeróbios com elevadas concentrações de matéria orgânica, fermentam aminoácidos e carboidratos (DE VOS *et al.*, 2009). Membros de *Ruminococcaceae* compõem a microflora indígena do trato intestinal de animais, são também encontradas em lodo de estações de tratamento anaeróbio de águas residuárias municipais, e podem ser isoladas a partir de fezes humanas (DEMIREL e SHERER, 2008). *Ruminococcaceae* também foi dominante (46,5%) em reator escala real, quando tratou RSU (CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2016).

Elevada abundância relativa de *Lachnospiraceae* e *Mogibacteriaceae* (6,8%), seguido por *Ruminococcaceae* (4,6%) foram observadas na amostra do biodigestor coletadas no dia 146 (Figura 6-3 (a)), comparado com amostra obtida no dia 220 (1%). *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* são bactérias altamente especializadas na degradação de materiais vegetais complexos. Os produtos da fermentação são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta, especialmente acetato, propionato e butirato (BIDDLE *et al.*, 2013). Membros de *Ruminococcaceae* podem requerer da amônia fonte de nitrogênio. A amônia é produzida pela degradação biológica da matéria orgânica nitrogenada, presente na proteína da fração orgânica de resíduo alimentar e de RSU (CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2016). Os grupos anteriormente descritos parecem estar relacionados com *Mogibacteriaceae*; até a data, características funcionais de *Mogibacteriaceae* são escassas, mas já foi reportado em associação com *Ruminococcaceae* (de VOS *et al.*, 2009). Outras famílias dentro do filo *Firmicutes* podem ter desempenhado importante papel na degradação da matéria orgânica em digestores como *Syntrophomonadaceae* e *Peptococcaceae* (4,0 a 7,0% do total de sequências) (Figure 6-3 (a)). Sequências de *Syntrophomonadaceae* (*Syntrophomonas* genus) foram observadas em todas as amostras investigadas, amostras dos inóculos e do digestor, mas teve aumento na abundância (de 2,0 % para 4,0%) com a elevação da COV. Esses resultados foram consistentes, com a elevada relação da AI/AP (>0,40) (Figura 6-2 (b)) observado no dia 220, indicando que ácidos orgânicos foram produzidos. *Syntrophomonadaceae* também foi dominante (4,0% do total de sequências) dentro do filo *Firmicutes* no dia 287, quando o digestor não foi alimentado. Membros desta família são predominantemente encontrados em ambientes metanogênicos, em associação sintrófica com arqueias metanogênicas. Podem oxidar ácidos graxos, assim como acetato, propionato e butirato, em sintrofia com arqueias metanogênicas, que utilizam o H<sub>2</sub> para manter as baixas concentrações no meio, propiciando a degradação de ácidos graxos. De fato, a presença predominante desse grupo no dia 286 e o baixo valor da AI/AP (<1,0) confirma que os ácidos orgânicos foram produzidos e subsequentemente, consumidos no digestor.

A família *Peptococcaceae* foi observada no lodo de UASB e nas amostras do digestor no dia 220 (com elevada COV), com predominância (7,5%) após aumento da COV. Os membros dessa família são fermentativos ou quimiorganotrófico, redutores de sulfato com complexo requerimento nutricional. Essas bactérias podem produzir energia através da fermentação de ácidos, purinas ou pirimidinas. Além disso, esses micro-organismos pertencem a um grupo de bactérias que oxidam ácidos graxos em reatores anaeróbios e podem usar o propionato como substrato (FELCHNER-ZWIRELLO, 2013). Dentro de *Peptococcaceae* o gênero

*Desulfosporosinus* (7,2%) foi o mais abundante, detectado no dia 220. Essas bactérias são acidofílicas redutoras de sulfato.

*Chloroflexi* foi o segundo filo mais abundante observado nas amostras do digestor (10 a 21% do total de sequências) (Figura 6-3. *Chloroflexi*, previamente identificada como bactérias verdes não sulfurosas, relativamente pouca estudada, inclui bactérias com diversificado metabolismo (HUG *et al.*, 2013). Foram relatadas somente sequências anaeróbias obrigatórias, como a família não fotossintética *Anaerolineaceae* (18,8% do total sequências). Nesse filo as amostras foram obtidas no dia 287. Membros de *Anaerolineaceae* estão envolvidas na degradação de sacarídeos (YAMADA *et al.*, 2006). Foram identificadas em reator de escala laboratorial mesofílico tratando resíduo alimentar com 8,9% do total de sequência (GUO *et al.*, 2014).

*Proteobacteria* foi o terceiro filo mais abundante observado nas amostras, e todos foram representados pela classe de *Proteobacteria* (Figura 6-4 (b)). Os mais abundantes foram *Deltaproteobacteria* (4,0 a 8,0% dos totais de sequências), *Betaproteobacteria* (1,0 a 3,0%) e *Gammaproteobacteria* (5,1%).

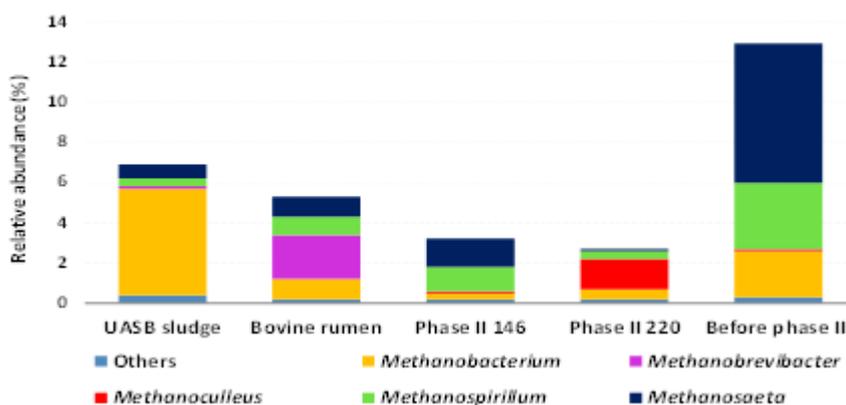
*Syntrophaceae* (gênero *Syntrophus*, 3,0 a 7,2%) e *Syntrophobacteraceae* (1,0 a 3,0%) foram as famílias mais abundantes dentro de *Deltaproteobacteria*, observadas em todas as amostras investigadas. Membros de *Syntrophaceae* são bactérias anaeróbias estritas que podem metabolizar usando a respiração, crescer apenas na presença de H<sub>2</sub> ou utilizar o formiato por meio da parceria sintrófica (como as metanogênicas hidrogenotróficas). Esta é a única família pertencente a *Deltaproteobacterias* que podem degradar ácidos graxos de cadeia longa (SOUSA *et al.*, 2009). Com a elevação da COV, a abundância relativa de bactérias sintróficas (*Syntrophaceae*) foi reduzida (de 7,2% para 3,0%) nas amostras do digestor.

*Bacterioidetes*, foi o quarto filo mais abundante observado nas amostras, composto por bactérias envolvidas nas etapas de hidrólises e acidogêneses da DA. O crescimento (de 3,1 para 16,2% do total de sequências) desse filo no digestor ocorreu com aumento da COV (Figura 6-2). Estudo prévio associou positivamente, a porcentagem dessas bactérias na atividade hidrolítica em digestores anaeróbios (REGUEIRO *et al.*, 2012). *Porphyromonadaceae* foi uma das famílias mais abundantes presentes nas amostras do digestor (0,5% do total de sequências no dia 146 com baixa COV; 2,5% no dia 220 com elevada COV e no dia 287, período sem alimentação). Membros deste grupo são anaeróbios obrigatórios, heterotróficos, não formadores de esporos e sacarolíticos. Essas bactérias podem

utilizar proteínas e outros substratos (KRIEG *et al.*, 2010). *Porphyromonadaceae* são bactérias envolvidas na degradação de proteínas, também registradas com alta abundância (54% do total de sequências) durante o estágio de start-up em reator anaeróbio tratando a fração orgânica de RSU (CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2016). *Chitinophagaceae* (gênero *Flavisolibacter*), teve limitada capacidade fermentativa (KRIEG *et al.*, 2010). Foi a segunda família com maior abundância (dentro de *Bacteroidetes*) detectada nas amostras, especificamente no rúmen bovino (2,5% do total de sequências).

#### 6.5.2.2. Composição das Arqueias Metanogênicas

O filo *Euryarchaeota* composto principalmente, por arqueia metanogênica, desempenhou importante papel na DA de resíduo alimentar, em todas as amostras (Figura 6-3). Entretanto, as porcentagens de abundâncias do digestor foram menores quando comparados com as amostras dos inóculos. A distribuição de sequências, em nível de gênero do domínio *Archaea* é apresentada na figura 6-5.



**Figure 6-5.** Composição taxonômica de metanogênicas em nível de gênero de cada amostra coletada pelo sequenciamento MiSeq/Illumina

Cinco gêneros de metanogênicas foram observados com abundância relativa >1,0%. Outros gêneros (<1,0%) foram agrupados em ‘outros’. *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*, ambas metanogênicas hidrogenotróficas, foram dominantes nas amostras de lodo UASB e rúmen bovino, respectivamente. Além disso, níveis similares de *Methanosaeta* e *Methanospirillum* também foram detectados (Figura 6-5). A operação do digestor ocasionou na redução da concentração de metanogênicas, alterando completamente a composição desse grupo. *Methanobrevibacter* não foi detectada nas amostras do digestor, enquanto

*Methanospirillum* foi observada em maior abundância em duas amostras do digestor, comparado com os inóculos.

### 6.5.3 Composição Microbiana das Amostras do Digestor e sua Relação com a Elevação da COV

A análise de sequenciamento massivo revelou que a elevação da COV, teve significativa influência sobre as estruturas da comunidade microbiana, no digestor escala de demonstração tratando resíduo alimentar. *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Chloroflexi* foram os filos predominantes observados com elevada COV (representando um total de 67% de sequências). Enquanto *Euryarchaeota* (metanogênicas) representou <4,0% do total das sequências. Mudanças na abundância do grupo bacteriano sintrófico foram observadas, com aumento da COV; *Syntrophaceae* foi dominante com a menor COV, enquanto *Syntrophomonas* e *Desulfosporosinus* predominaram com elevada COV (Tabela 6-1).

Foram observados também, alterações na comunidade metanogênica com aumento na COV (Figura 6-5). A baixa COV (fase II, dia 146), *Methanosaeta* e *Methanospirillum* foram observadas em abundâncias relativas comparáveis, indicando a importância tanto das metanogênicas acetoclásticas, quanto das hidrogenotróficas. Isso pode ter contribuído para o estável desempenho do digestor durante o período (AI/AP <0,1, Figura 6-2 (b)), do que observado no final da fase II (dia 220, AI/AP >0,4). Com elevada TCO (dia 220), *Methanoculleus* dominou e *Methanosaeta* desapareceu devido o aumento das condições ácidas no meio, indicando que a produção de metano foi realizada por metanogênicas hidrogenotróficas. As metanogênicas hidrogenotróficas (como *Methanoculleus*) são capazes de tolerar condições ácidas, e de fácil adaptação em ambientes desequilibrados (BAN *et al.*, 2013). Além disso, *Methanoculleus* pode utilizar o formiato e álcoois secundário, tais como o propanol e o butanol como doadores de elétrons na rota da metanogênese.

O aumento na relação entre AI/AP (>0,40) com elevada COV aplicada no digestor (2,4 kgSV m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), indicou formação de ácidos graxos voláteis no sistema, e conseqüentemente, maior produção e disponibilidade de hidrogênio. Esta condição é consistente com a composição bacteriana, em que a abundância na fermentação ocorreu por bactérias hidrolíticas e sintróficas oxidadoras de ácidos graxos, como *Syntrophomonadaceae* e *Desulfosporosinus* (WORM *et al.*, 2014), observadas no dia 220 com a maior carga alimentar, comparada com a amostra do dia 146 com menor carga alimentar (Tabela 6-2).

A ocorrência de *Methanoculleus* com bactérias sintróficas produtoras de hidrogênio *Syntrophomonas* e *Desulfosporosinus* (WORM *et al.*, 2016) na fase com elevada COV, pode ser explicado pelo fato de que, *Methanoculleus* (e outros metanogênicos hidrogenotróficos) interagem apenas com bactérias específicas para o fornecimento de H<sub>2</sub> (KATO *et al.*, 2010). A presença de *Methanoculleus* (0,5%) e *Syntrophomonas* (2,0%) foi reportada em reator mesofílico em escala laboratorial, com digestão de substratos ricos em proteínas (estrume bovino e silagem de peixe) na fase de start-up, demonstrando a resistência dessas arqueias (SOLLI *et al.*, 2014).

No geral, a abundância de potenciais bactérias sintróficas observadas (>8,9% do total de sequências), indica a importância da sintrofia na produção de metano no digestor de resíduo alimentar (Tabela 6-2).

Quando o digestor esteve em estágio estacionário, sem alimentação, antes da fase III, dia 286, o ambiente foi favorável para o desenvolvimento e crescimento das arqueias metanogênicas, devido às condições estáveis induzidas pelo consumo dos ácidos orgânicos (indicado pela AI/AP<0,1) por bactérias que oxidam ácidos graxos, como as *Syntrophomonas* (Figura 6-2 (b)). Portanto, a abundância relativa das metanogênicas aumentou significativamente de 3,0% para 13% do total das sequências (Tabela 6-2). A acetoclástica *Methanosaeta* foi a arqueia metanogênica dominante durante este período. No entanto, metanogênicas hidrogenotróficas como *Methanospirillum* e *Methanobacterium* também foram detectadas em abundância, indicando que ambas rotas de produção de metano ocorreram durante este período. *Methanosarcina*, metanogênica conhecida com metabolismo versátil, relatada como dominante na DA (DEMIREL e SHERER, 2008), foi detectada com baixas abundâncias nas amostras dos inóculos (0,4%) e do digestor (<0,2%) (Figura 6-5).

Os primeiros sinais de desequilíbrio do processo, foram observados com a redução do teor de metano no biogás (<48,5%) e o aumento na relação AI/AP (> 0,40), com uma COV de 2,4 kgSVM<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> (final da fase II). A abundância relativa de metanogênicas não alterou (~ 3% das sequências totais), apesar da diminuição no rendimento de metano. Os resultados observados nesse estudo diferiram do trabalho de Guo *et al.* (2014), que tratou resíduo alimentar em reator escala laboratorial a 35°C, com diferentes COV (1,0 a 2,5 kgSVM<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>). Em Guo *et al.* (2014), as *Methanosarcinas* dominaram a comunidade metanogênica, com baixa COV (período de aclimatação), enquanto *Methanosaeta* foi favorecida com elevada COV.

**Tabela 6-2.** Composição taxonômica da comunidade microbiana em nível de filo das sequências obtidas a partir das amostras do digestor

Abundância Relativa (%)	Dia 146	Dia 220	Dia 286
<i>Firmicutes</i> (bactérias fermentadoras)	25,5	45,4	25,5
<b><i>Syntrophomonadaceae</i></b> <b>(<i>Syntrophomonas</i>)</b>	<b>2,0</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>
<b><i>Peptococcaceae</i> (<i>Desulfosporosinus</i>)</b>	<b>0,0</b>	<b>7,2</b>	<b>0,0</b>
<b><i>Clostridiaceae</i> (<i>Clostridium</i>)</b>	<b>1,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>
<i>Chloroflexi</i>	21,8	10,8	18,5
<i>Proteobacteria</i>	17,3	8,1	6,0
<b><i>Syntrophaceae</i></b>	<b>7,2</b>	<b>2,5</b>	<b>3,7</b>
<b><i>Syntrophobacteraceae</i></b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
<i>Bacteroidetes</i> (acidogênica/hidrolítica)	3,1	9,5	16,2
<i>Phorphyromonadaceae</i>	0,4	2,6	2,5
<i>Synergistetes</i> (degradadora de proteína)	4,6	6,7	8,8
<i>Dethiosulfovibrionaceae</i>	3,5	2,3	4,2
<i>Synergistaceae</i>	0,2	2,2	1,8
<i>Euryarchaeota</i> (metanogênica)	3,5	3,0	13
Metanogênica hidrogenotrófica	2,0	2,8	6,0
Metanogênica acetoclástica	1,5	0,2	7,0
<i>Actinobacteria</i>	6,0	1,7	2,3
<i>Propionibacteriaceae</i>	0,2	1,0	2,1
<i>Bifidobacteriaceae</i>	5,6	0,0	0,0
<i>Planctomycetes</i>	8,4	4,5	3,2
<i>Phycisphaerae</i>	8,2	1,5	2,8
<i>Pirellulaceae</i>	0,2	3,0	0,3
Grupos menores	0,7	1,5	1,8
Não classificados	6,2	5,6	0,3

Nota: As potenciais bactérias sintróficas são retratadas em negrito.

A diferença observada na comunidade bacteriana, desenvolvida em cada reator pode estar atribuída ao tipo de inóculo e/ou condições operacionais aplicadas. O estudo anterior utilizou lodo de digestor anaeróbio, tratando águas de esgoto doméstico de lodo UASB e rúmen bovino. A COV aplicada nesse estudo foi maior (1,2 a 2,4 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>) comparado com estudo prévio (1,0 a 2,5 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>). Apesar do elevado rendimento de metano observado durante a fase II (com elevada COV), a abundância de metanogênica foi semelhante à observada com baixa COV (Tabela 6-1). Entretanto, a elevação da COV afetou na composição, e não na abundância da comunidade metanogênica. A elevada COV resultou na aceleração da hidrólise e acidogênese, induzindo proliferação seletiva de bactérias sintróficas produtoras de hidrogênio (*Syntrophomonas* e *Desulfosporosinus*) e metanogênicas hidrogenotróficas (*Methanoculleus*). Esta condição alterou a rota para a produção de metano no digestor para dominância da metanogênese hidrogenotrófica com alta COV. No entanto, o digestor teve um período estacionário, sem alimentação, após a elevação da COV, o que promoveu mudanças na comunidade microbiana, seletiva para as metanogênicas (15,0%)

consumidoras de acetato e hidrogênio, e grupos bacterianos favoráveis. Indicando que ocorreu tanto a via acetoclástica, quanto a via hidrogenotrófica durante nesse período.

## **6.6 Conclusões**

O digestor anaeróbio que tratou o resíduo alimentar exibiu melhor desempenho durante as fases I e II com COV variando de 1,0 a 2,4 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, comparado com a fase III (COV ~ 1,0 a 1,5 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), quando o resíduo alimentar foi acidificado no tanque de alimentação, antes de ser enviado para o digestor. Um aumento na COV induziu mudanças na composição microbiana, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram seletivamente enriquecidas, enquanto *Proteobacteria* e *Chloroflexi* diminuíram em abundância. Foram observadas mudanças na composição metanogênica, e não na abundância, em resposta à elevação na COV. *Methanosaeta* quase desapareceu com elevada COV, decorrente das condições ácidas, enquanto *Methanoculleus* foi favorecida. Interações sintróficas entre produtores de hidrogênio e metanogênicos hidrogenotróficos, foram evidentes com elevada COV. Esses resultados, indicam que a metanogênese hidrogenotrófica, contribuiu significativamente para a produção de metano com elevada COV (> 2,0 kgSVm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>), quando comparado com baixa COV ou, no período estacionário, sem alimentar o digestor.

## 7 EFEITO DA ADIÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO E A COMUNIDADE MICROBIANA ENVOLVIDA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUO ALIMENTAR

### *Objetivo Específico 2*

#### *7.1 Introdução*

Os resíduos orgânicos são considerados como bons substratos para a produção de metano a partir da digestão anaeróbica (YOON *et al.*, 2014). Os processos de hidrólise, acidogênese e metanogênese da digestão anaeróbica, são amplamente utilizados para a degradação biológica de resíduos orgânicos e para a produção de biogás. Todo o processo de digestão anaeróbica envolve a ação de diferentes micro-organismos, que atuam em conjunto para realizar a degradação da matéria orgânica e consequente, formação de metano e dióxido de carbono. O rendimento de metano, a partir de material orgânico digerido é resultado da atividade microbiana anaeróbica, que depende das características do substrato (proteína, lipídios, carboidratos, lignina, celulose, hemicelulose, entre outros) e dos níveis de fatores inibitórios gerados durante o processo de digestão anaeróbica (ANGELIDAKI e AHRING, 1992).

A determinação do potencial bioquímico de metano (PBM) tem sido utilizada para mensurar a produção de metano oriundo da taxa de conversão da matéria orgânica, durante a decomposição anaeróbica (CHYNOWETH *et al.*, 1993; ANGELIDAKI *et al.*, 2009; RAPOSO *et al.*, 2011).

A determinação de BMP para diferentes resíduos orgânicos é necessária, porque o processo de degradação anaeróbica é altamente influenciado pelas características intrínsecas do substrato dos materiais orgânicos. Por esse motivo, foram realizados estudos específicos sobre o efeito da razão substrato/inóculo (S/I) para vários resíduos orgânicos, como resíduo alimentar, fração orgânica de resíduo sólido urbano e biomassa vegetal (CHYNOWETH *et al.*, 1993; RAPOSO *et al.*, 2006; DEUBLEIN e INHAUSER, 2010).

A relação S/I pode ser expressa como a massa de sólidos voláteis (SV) no substrato pela quantidade de SV presente no inóculo. Na literatura, há relatos que os rendimentos máximos de metano foram obtidos com razões S/I de 0,5 a 1,0 em sistemas de digestão anaeróbica com a fração orgânica de resíduo urbano (FORSU) (CHYNOWETH *et al.*, 1993).

O tratamento biológico dos resíduos requer, não somente matéria orgânica, mas também de nutrientes essenciais para o crescimento dos micro-organismos. Dentre esses nutrientes se encontram os elementos de transição, tais como: ferro, cobalto, níquel, molibdênio e tungstênio, que são essenciais como cofatores enzimáticos, envolvidos na bioquímica da formação do metano. Esses elementos são necessários como estímulo para estabilidade do processo, evitando assim, no acúmulo de ácidos orgânicos que são prejudiciais, principalmente na fase de maior interesse, a metanogênese. Além disso, as concentrações de elementos traço existentes no resíduo alimentar, não suprem as necessidades requeridas pela comunidade microbiana (tabela 7-3) (ZANDVOORT *et al.*, 2006; DEMIREL e SCHERER *et al.*, 2011; SHATTAUER *et al.*, 2011; BANKS *et al.*, 2012; FACCHIN *et al.*, 2013; CESTONARO, 2014; PAULO *et al.*, 2015; YIRONG *et al.*, 2015).

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos de diferentes relações S/I (0,5 e 1,5), e da adição de elementos traço em diferentes concentrações e combinações, sobre a comunidade microbiana e a potencial produção de metano. E verificar se a adição de elementos traço é necessária e viável a custo benefício. Para tanto, ensaios de determinação do potencial bioquímico de metano (BMP) foram realizados, com diferentes lodos de inóculo e diferentes relações S/I, com e sem adição de elementos traço, para a seleção de um inóculo adequado ao tipo de substrato, e a relação S/I com melhor desempenho na degradação do substrato, e consequentemente maior produção de metano.

O efeito da adição de elementos traço sobre a diversidade e a composição das comunidades de bactérias e de arqueias metanogênicas foi investigado por meio de sequenciamento de nova geração IonTorrent/Life. Uma vez que não há registro de micro-organismos identificados com estudos de BMP com adição de elementos traço.

## **7.2 Materiais e Métodos**

### **7.2.1 Experimentos em Batelada com e sem adição de elementos traço**

Para a determinação do Potencial Bioquímico de Metano (BMP) a partir do resíduo alimentar, foram realizados vários testes utilizando o equipamento ‘sistema automático para o potencial teste de metano – AMPTS II’, constituído com o software Bioprocess control, Suécia AB, 2013, por ser rápido e mensurar os volumes de metano de forma online.

O sistema AMPTS consiste de três unidades: Unidade A, um banho de água mantido a temperatura mesofílica (30° C), com 15 frascos reatores de 0,6 L de vidro do tipo Shott para

digestão anaeróbia; Unidade B, unidade de adsorção de gás, incluindo dióxido de carbono e sulfeto de hidrogênio, com 15 frascos de vidro do tipo Shott de 80 mL com hidróxido de sódio (NaOH) a 3 M; e a unidade C, na qual o volume de metano liberado da unidade A era gravado automaticamente pelo software Bioprocess Control. Uma haste de mistura com rotação mecânica lenta era acoplada em cada frasco reator na unidade A. A rotação consistiu de 120 segundos de agitação com parada de 60 segundos por rodada. O tempo de duração dos testes foi determinado pela biodegradabilidade do substrato, até que a produção de metano atingisse a estabilidade e começasse a diminuir, com variação de 7 a 25 dias.

As relações substrato/inóculo (S/I) adotadas foram baseadas na literatura, a menor razão de 0,5 (ANGELIDAKI *et al.*, 2009) e a maior razão de 1,5 (YOON *et al.*, 2015), com e sem adição de elementos traço em separado e, em combinação, conforme tabela 7-1. O lodo de inóculo usado foi retirado fresco de um digestor de 18,8 m<sup>3</sup> que trata resíduo alimentar do restaurante universitário (setorial 2) da UFMG, Brasil. O resíduo alimentar testado era coletado do tanque de alimentação que abastece o digestor anaeróbio, portanto, foi o mesmo resíduo usado na digestão anaeróbia em escala de demonstração.

Para cada batelada de teste foi adotado um volume de trabalho de 0,4 L e 0,2 L de *head space*, a 30°C. Um dos frascos reator foi utilizado como branco (contendo somente lodo de inóculo sem resíduo), dois frascos foram usados como controle (contendo resíduo alimentar + inóculo - sem adição de elementos traço) e quatro conjuntos de triplicatas com os testes (contendo resíduo alimentar + inóculo + elementos traço). Foram suplementados os elementos traço Mo, Fe, Ni e Co, em separado, e em diferentes combinações e concentrações.

Antes da montagem dos testes, foram realizadas análises da série de sólidos para obtenção da concentração de sólidos voláteis e, por conseguinte, a realização dos cálculos e obtenção dos volumes de resíduo alimentar e de inóculo a serem adicionados, conforme a relação S/I desejada. Os resultados dos sólidos de todos os testes estão apresentados na tabela 7.2. Sólidos totais (TS) e sólidos voláteis (SV) foram determinados de acordo com a metodologia descrita pela APHA, 2005.

**Tabela 7-1.** Testes de BMP com adição de elementos traço nas diferentes condições testadas

Teste	Razão S/I	Massa de substrato adicionada (g SV)	Massa de inóculo adicionada (gSV)	Condição
1	0,5	4,7	9,5	<b>Adição de FeCl<sub>3</sub></b> nas concentrações: 5,0; 25,0; 250,0 e 2500 mg/L.
2	0,5	7,24	14,25	<b>Adição de CoCl<sub>2</sub></b> nas concentrações: 1,0; 5,0; 10,0 mg/L.
3	0,5	4,4	8,96	<b>Adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo</b> nas concentrações: 0,5; 5,0; 15,0 e 50,0 mg/L.
4	0,5	5,37	10,9	<b>Adição de NiCl<sub>2</sub></b> nas concentrações: 0,25; 0,5; 1,0 e 5,0 mg/L.
5	0,5	5,67	11,7	<b>Adição da combinação dos elementos traço nas concentrações (mg/L):</b> A: CoCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; B: CoCl <sub>2</sub> [10,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; C: CoCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]; D: CoCl <sub>2</sub> [10,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L].
6	1,5	9,6	6,37	<b>Adição da combinação dos elementos traço nas concentrações (mg/L):</b> A: CoCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; B: CoCl <sub>2</sub> [10,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; C: CoCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]; D: CoCl <sub>2</sub> [10,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L].
7	0,5	5,88	12,43	<b>Adição da combinação dos elementos traço nas concentrações (mg/L):</b> A: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [0,5], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; B: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [5,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; C: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [0,5 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]; D: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [5,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L].
8	1,5	14,99	10,05	<b>Adição da combinação dos elementos traço nas concentrações (mg/L):</b> A: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [0,5], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; B: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [5,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]; C: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [0,5 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]; D: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo [5,0 mg/L], FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L].

Adicionados os volumes de resíduo alimentar, inóculo e de elementos traço em cada frasco reator, fazia-se as medições de pH com a combinação de eletrodo calibrado em solução

tampão 4, 7 e 9. As correções de pH foram realizadas com solução CaO hidratada, nos testes com relação S/I 1,5, uma vez que havia maior proporção de substrato (resíduo alimentar). Após as medições de pH e o fechamento de todos os frascos reatores era realizada uma lavagem, com gás nitrogênio no interior de cada frasco, para manutenção da anaerobiose. A seguir os frascos reatores eram conectados no equipamento com o start-up via software Bioprocess Control, sistema computadorizado.

**Tabela 7.2-** Concentração de sólidos determinada para as diferentes amostras de resíduo e lodo usadas nos ensaios de 1 a 8 com a adição dos elementos traço

	Substrato (resíduo alimentar)			Inóculo/Lodo		
	ST (g/L)	SV (g/L)	SV/ST	ST (g/L)	SV (g/L)	SV/ST
<b>Teste 1</b>	59,1	55,8	0,94	65,8	37,4	0,57
<b>Teste 2</b>	15,0	13,5	0,90	65,8	37,4	0,57
<b>Teste 3</b>	13,7	12,2	0,89	68,0	40,8	0,60
<b>Teste 4</b>	20,7	18,5	0,89	52,1	30,0	0,58
<b>Teste 5</b>	59,0	55,9	0,95	54,8	32,5	0,59
<b>Teste 6</b>	59,1	55,8	0,94	29,3	12,5	0,43
<b>Teste 7</b>	16,7	14,3	0,86	56,1	31,7	0,57
<b>Teste 8</b>	12,9	11,9	0,92	5,8	3,9	0,67

### 7.2.2 Produção de Metano

Os resultados da produção de metano foram expressos em volume acumulado de metano por quilo de sólidos voláteis ( $\text{CH}_4/\text{NmLCH}_4/\text{gSV.dia}$ ) em formato de planilha do tipo excel. A taxa máxima foi calculada entre a razão do volume final máximo de metano (mL), e o tempo de duração da fase exponencial (dia), traçando uma reta com o coeficiente angular para cada teste. O resultado foi expresso em  $\text{mLCH}_4/\text{d}$ . Para o incremento ou rendimento de metano nos ensaios foi realizado cálculos de porcentagem com base no resultado de BMP do controle e, fazendo a diferença para obtenção do resultado final em porcentagem (%). Para o potencial bioquímico de metano (BMP) em  $\text{NmLCH}_4/\text{gSV}$ , o volume acumulado de metano gerado no experimento deve ser dividido pela quantidade de substrato orgânico (SV) adicionado. Assim, como no lodo de inoculo tem-se matéria orgânica residual e, portanto, este também produz metano (mesmo sem adição do resíduo alimentar- alimento), então para a determinação do BMP dos outros frascos (a partir do resíduo), subtraiu-se o valor de metano produzido pelo branco (que é o frasco contendo somente inóculo, sem alimentação).

Assim, como o resíduo orgânico presente no inóculo (SV) adicionado produz biogás e sua fração volumétrica de biometano deve ser subtraída do volume acumulado total de biometano para obter a verdadeira produção a partir do substrato, conforme equação 1:

$$BMP = \frac{\bar{X} \text{ vol, acumulado } CH^4 \text{ amostra} - \bar{X} \text{ vol, acumulado } CH^4 \text{ branco} * 1}{SV \text{ substrato}}$$

Equação 1

### 7.2.3 Procedimentos Analíticos

Para as análises de elementos traço (ferro, zinco, manganês e níquel), os volumes das amostras de resíduo alimentar e de inóculo/lodo foram utilizados 200 mL disponibilizados em recipientes de alumínio, e submetidos à secagem em estufa a 65 °C por 12 horas. Após a secagem as amostras eram maceradas de forma manual com uso de almofariz e pistilo de porcelana. As amostras maceradas eram pesadas em balança analítica para obtenção de massa de 0,2 g. Essa massa de 0,2 g de resíduo alimentar e de lodo de inóculo eram submetidas a digestão ácida em chapa aquecedora, com final de 6 mL de ácido nítrico aferido a 50 mL, conforme metodologia EPA 3050B. A seguir, o volume final de 50 mL era analisado por espectrometria de chama com acetileno, com fluxo de 13,50 L/minuto. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Química da UFMG, por meio do equipamento Agilent Technologies 200 Series AA.

As concentrações de nitrogênio total das matrizes de resíduo alimentar e inóculo/lodo foram determinadas pelo método Kjeldahl com 0,2 g de massa de amostra macerada (BREMNER, 1996). Procedimento por digestão ácida em bloco digestor, com adição de ácido salicílico, para quantificação das formas nítricas, possibilitando na conversão de todo o nitrogênio presente na amostra, em amônio ( $NH_4^+$ ) e, posteriormente, em amônia ( $NH_3$ ) pelo processo de destilação, utilizando destilador de nitrogênio (MA, 036 plus, Marconi, 220 v). A amônia arrastada pelo vapor de água era recolhida em solução de ácido bórico, no qual a quantificação de nitrogênio total era obtida de acordo com a metodologia descrita por Matos, 2015. A caracterização das amostras de resíduo alimentar e lodos (usados como inoculo) está apresentada na tabela 7.3.

**Tabela 7-3.** Concentrações de metais no resíduo alimentar e no inóculo

Parâmetros	Resíduo Alimentar	Lodo	Resíduo Alimentar	Resíduo Alimentar	Resíduo Alimentar
	Nesse estudo		Zhang <i>et al.</i> (2007)	Zhang <i>et al.</i> (2011)	Yrong <i>et al.</i> (2015)
Ferro (mg/L)	138,16	1015,7	198,32±7,77	<sup>b</sup> 3,17	<sup>b</sup> 89,0
Zinco (mg/L)	2,55	6,77	19,68±5,70	<sup>b</sup> 8,27	-
Manganês (mg/L)	ALD	1,6	15,53±7,77	<sup>b</sup> 0,96	<sup>b</sup> 0,92
Cobre (mg/L)	0,2	9,7	8,03±0,26	<sup>b</sup> 3,06	-
Níquel (mg/L)	0,63	4,8	0,52±0,26 <sup>b</sup>	<sup>b</sup> 0,19	-
Nitrogênio (dag kg <sup>-1</sup> )	3,75	4,2	3,16±0,22	3,54 (%ST)	3,0 (%ST)
Lipídio	1,2 <sup>a</sup>	-	-	23,3 (g/L)	-
Carboidrato	2,14 <sup>a</sup>	-	-	111,7 (g/L)	-
Proteína	1,86 <sup>a</sup>	-	-	32,9 (g/L)	-

ALD: Abaixo do limite de detecção; <sup>a</sup>Valor expresso em g/100 g; <sup>b</sup>mg/L

#### 7.2.4 Análise da Comunidade Microbiana através de Sequenciamento de Nova Geração usando a Plataforma Ion Torrent

Para investigar o efeito da adição de elementos traço sobre a diversidade e a composição da comunidade microbiana, eram coletadas no final dos testes, 50 mL de amostras (ao final de cada teste) do controle (inóculo + resíduo alimentar) e dos testes com adição de elementos traço (inóculo + resíduo alimentar + elementos traço). A partir de cada triplicata frascos que receberam elementos traço e duplicata do controle, sem adição de elementos traço foram realizadas amostras compostas. Essas amostras foram congeladas em freezer -80 °C. O DNA total foi extraído com o kit de isolamento de DNA PowerSoil® (Mobio Laboratories, EUA). A pureza do DNA foi medida em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, ThermoScientific). As amostras de DNA foram enviadas para a empresa MrDNALab (Texas, EUA) para a construção da biblioteca e sequenciamento na plataforma IonTorrent (Life) juntamente com a análise de bioinformática.

Os primers utilizados na reação de amplificação foram 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 926R (CCGTCAATTCMTTTRAGT) que delimitam a região V4 e V5 do rRNA 16S para bactérias e arqueias (CAPORASO *et al.*, 2011). Para o PCR foram utilizadas 30 corridas em única batelada usando o Kit Mix Master Plus HotStarTaq (Qiagen, EUA), nas seguintes condições: 94 ° C por 3 minutos, seguido de 28 ciclos (5 ciclos utilizados em produtos de PCR) de 94 °C durante 30 segundos, 53 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após a realização da corrida de alongamento 72 °C por 5 minutos.

O sequenciamento pela plataforma Ion Torrent foi realizado conforme as diretrizes do fabricante MR DNA ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com)). Os dados das sequências foram processados pelo mothur com ordenação por comprimento, desreplicação das sequências e classificação por abundância e cluster para correção de erros e consenso de saída. Assim, atribuição dos números sequenciais às OTUs. Neste, houve a remoção de interferentes, como de sequências ambíguas e abaixo de 150 pb, e de quimeras. As unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram definidas por agrupamento em 3% de divergência (97% de similaridade). As UTOs finais foram classificadas usando BLASTn e comparadas em um contra banco de dados, o RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu>) e NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) com alinhadores atualizados de *Archaea* e *Bactéria*.

### **7.3 Resultados e Discussão**

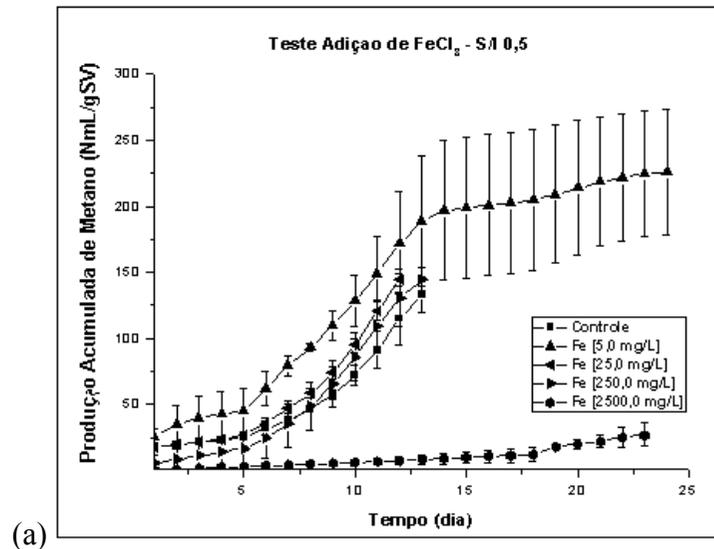
#### 7.3.1 Produção Acumulada de Metano

Na figura 7-1(a) são apresentados os resultados do teste 1 com diferentes concentrações de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), em uma relação S/I de 0,5, juntamente com o controle sem adição deste elemento traço. O maior rendimento médio de metano foi observado nos frascos com adição de  $\text{FeCl}_3$  [5,0 mg/L] com 226,10 NmL $\text{CH}_4$ /gSV (cerca de 50% de incremento em relação ao frasco-controle). O controle (com apenas substrato e inóculo), sem adição de  $\text{FeCl}_3$  apresentou volume médio acumulado de 146,70 NmL $\text{CH}_4$ /gSV. As concentrações  $\text{FeCl}_3$  [25 mg/L] e [250,0 mg/L] obtiveram valores médios acumulados de 146,95 e 155,20 NmL $\text{CH}_4$ /gSV, respectivamente, indicando que não houve qualquer efeito da adição de elementos traço. Para os frascos com concentração de  $\text{FeCl}_3$  [2500 mg/L], o volume médio de 29,15 NmL $\text{CH}_4$ /gSV (muito abaixo da produção de metano observada nas outras concentrações e mesmo no frasco-controle; sugerindo portanto, que houve inibição da comunidade microbiana quando da adição da maior concentração de ferro.

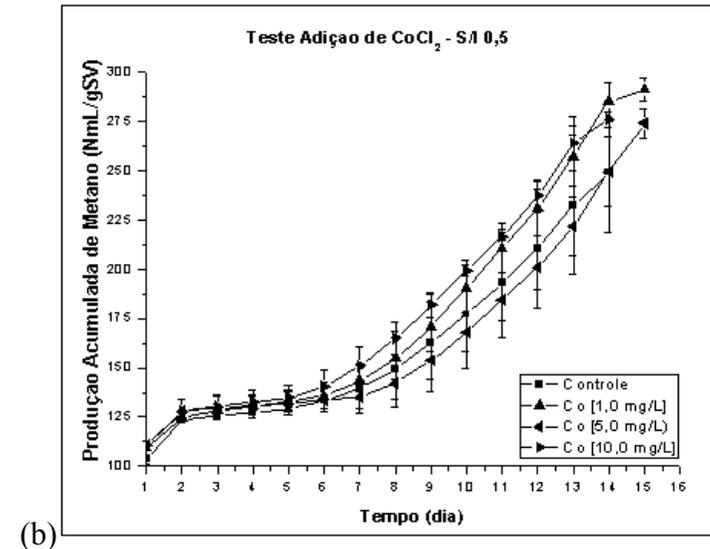
Na figura 7-1(b) são apresentados os resultados do teste 2 (S/I 0,5) com adição de cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), juntamente com o controle sem a adição deste elemento traço. Os frascos com adição de  $\text{CoCl}_2$  [1,0 mg/L] apresentaram a maior produção média de  $\text{CH}_4$  com 291,45 NmL/gSV (cerca de 15,7% de incremento de metano em relação ao frasco-controle). Já os frascos com adição de  $\text{CoCl}_2$  [10,0 mg/L] apresentaram volume médio de 279,0 NmL $\text{CH}_4$ /gSV, semelhante ao volume de metano produzido pelo frasco-controle (279,3 NmL $\text{CH}_4$ /gSV). Em geral, verificou-se que a medida que as concentrações de  $\text{CoCl}_2$  foram aumentando, houve produção acumulada de metano menor ou igual ao frasco-controle,

sugerindo, portanto, que houve inibição da comunidade microbiana quando da adição da maior concentração de ferro.

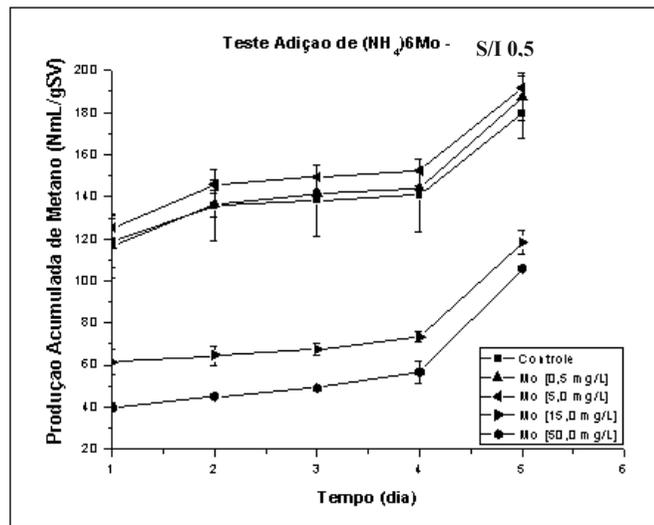
Com relação ao teste 3, com adição de molibdato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo) (S/I 0,5) em diferentes concentrações, os resultados são mostrados na figura 7-1 (c). A maior produção média de volume acumulado de CH<sub>4</sub> foi observada no frasco com a adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo [5,0 mg/L] com 191,6 NmLCH<sub>4</sub>/gSV (cerca de 5,0% de incremento em relação ao frasco-controle); seguido de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo [0,5 mg/L] com produção média acumulada de 187,4 NmLCH<sub>4</sub>/gSV. Os frascos com adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo [15,0 mg/L] e (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo [50,0 mg/L] apresentaram produção média acumulada de 126,0 NmLCH<sub>4</sub>/gSV e 105,7 NmLCH<sub>4</sub>/gSV, respectivamente; valores inferiores à produção de metano do frasco controle (183,35 NmLCH<sub>4</sub>/gSV) sugerindo que houve inibição da comunidade quando adicionada maiores concentrações de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo (Figura 7-1 (c)). Vale ressaltar que o teste branco, apenas com inóculo houve produção de 65,0 NmLCH<sub>4</sub>/gSV. Em todos os testes houve um branco, entretanto, não inserido por terem tido pequena ou às vezes nula produção de metano, por esta razão não foi apresentada nos gráficos a seguir.



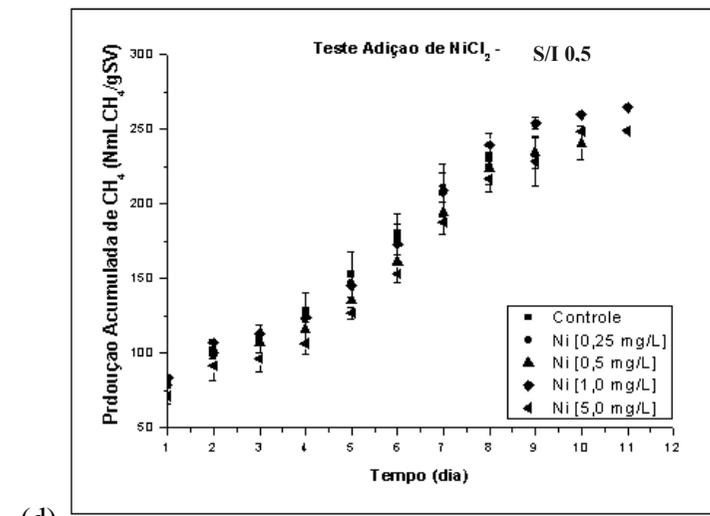
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 7-1.** Média da produção acumulada de metano nos testes com adição de elementos traço: teste 1: diferentes concentrações de cloreto férrico (a), teste 2 com adição de cloreto de cobalto (b), teste 3, com adição de molibdato de amônio (c) e, teste 4 com adição de cloreto de níquel (d). O teste branco não foi inserido pela baixa produção de metano ou as vezes nula.

No teste 4 com adição de níquel, houve maior produção média acumulada de metano no valor de 265,0 NmLCH<sub>4</sub>/gSV; quando se adicionou concentrações de níquel de [1,0 mg/L], com incremento de 16,3%. Quando se adicionou 5,0 mg/L de Ni [houve produção média de 249,0 NmLCH<sub>4</sub>/gSV com incremento de 8,8% em relação ao frasco controle (sem adição dos elementos traço) que produziu 230,0 NmLCH<sub>4</sub>/gSV. A menor concentração de Ni [0,25 mg/L] adicionada apresentou valor de produção de metano (232,8 NmLCH<sub>4</sub>/gSV), similar à do frasco-controle. Em função desses resultados, nos próximos ensaios, optou-se por utilizar em combinação com outros elementos as concentrações mínima e máxima de níquel, ou seja, Ni [0,5 mg/L] e [5,0 mg/L] (tabela 7-1 e figura 7-1 (d)).

Após a realização dos ensaios com adição de CoCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo e NiCl<sub>2</sub> em separado, foram feitos ensaios com a mistura desses elementos traço, utilizando as concentrações que resultaram em incremento na produção de metano. Nos ensaios 5 e 6 testou-se a combinação de diferentes concentrações de cobalto, ferro e níquel para as razões S/I de 0,5 e 1,5, respectivamente; e nos ensaios 7 e 8 a combinação de cobalto ferro e molibdênio em diferentes concentrações para a relação S/I de 0,5 e 1,5, respectivamente (conforme apresentado na Tabela 7.1).

No teste 5 com adição da mistura de elementos traço com razão S/I 0,5, os ensaios partiram diretamente para a fase exponencial, sem fase lag (ver APÊNDICE). A combinação C: CoCl<sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl<sub>3</sub> [50,0 mg/L] e NiCl<sub>2</sub> [5,0 mg/L] foi a que apresentou o maior valor médio de metano acumulado de 377,5 NmLCH<sub>4</sub>/gSV CH<sub>4</sub> (cerca de 12% maior que o frasco-controle). Neste caso, o NiCl<sub>2</sub> [5,0 mg/L] parece ter sido a maior influência no incremento da produção de CH<sub>4</sub>. As combinações B e D apresentaram valores de produção acumulada de metano semelhantes (365,3 e 365,6 NmLCH<sub>4</sub>/gSV, respectivamente) que correspondeu a um incremento no rendimento de metano de aproximadamente 60%. Em ambas as combinações, as concentrações de CoCl<sub>2</sub> [10,0 mg/L] e NiCl<sub>2</sub> [0,5 mg/L] foram semelhantes, a diferença foi nas concentrações de FeCl<sub>3</sub>, na qual houve redução de [50,0 mg/L] para [5,0 mg/L]. Tal redução na concentração de cloreto férrico não influenciou na produção de metano (já que os valores foram semelhantes). O ensaio A: CoCl<sub>2</sub> [1,0 mg/L], FeCl<sub>3</sub> [5,0 mg/L] e NiCl<sub>2</sub> [0,5 mg/L] apresentou o menor valor médio acumulado de metano (de 349,2 NmLCH<sub>4</sub>/gSV), comparado ao controle com 336,9 NmL de CH<sub>4</sub>/gSV de volume médio acumulado (Figura 7-2 (d)).

No teste 6, combinação A:  $\text{CoCl}_2$  [1,0 mg/L],  $\text{FeCl}_3$  [5,0 mg/L] e  $\text{NiCl}_2$  [0,5 mg/L], verificou-se os maiores valores de volume acumulado de metano (605,25 NmLCH<sub>4</sub>/gSV), representando um incremento de metano de quase 20% em relação ao frasco-controle; seguido da combinação D:  $\text{CoCl}_2$  [10,0 mg/L],  $\text{FeCl}_3$  [5,0 mg/L] e  $\text{NiCl}_2$  [0,5 mg/L] com volume médio acumulado de 577,3 NmLCH<sub>4</sub>/gSV. Em geral, as combinações 6-A e 6-D apresentaram os maiores volumes de CH<sub>4</sub>, e a diferença entre ambas, estava no aumento das concentrações de  $\text{CoCl}_2$  [1,0 mg/L] para [10,0 mg/L] (Figura 7-2 (e)).

No ensaio 6-B:  $\text{CoCl}_2$  [10,0 mg/L],  $\text{FeCl}_3$  [50,0 mg/L] e  $\text{NiCl}_2$  [0,5 mg/L] verificou-se volume médio acumulado de 492,0 NmLCH<sub>4</sub>/gSV. Quando se compara as combinações 6-B e 6-D, verifica-se que houve redução no volume de metano de 577,3 NmLCH<sub>4</sub>/gSV para 492,0 NmLCH<sub>4</sub>/gSV, fato que deve estar relacionado a maior concentração de  $\text{FeCl}_3$  [50,0 mg/L] no ensaio 6-B, indicando que a combinação 6-D foi melhor.

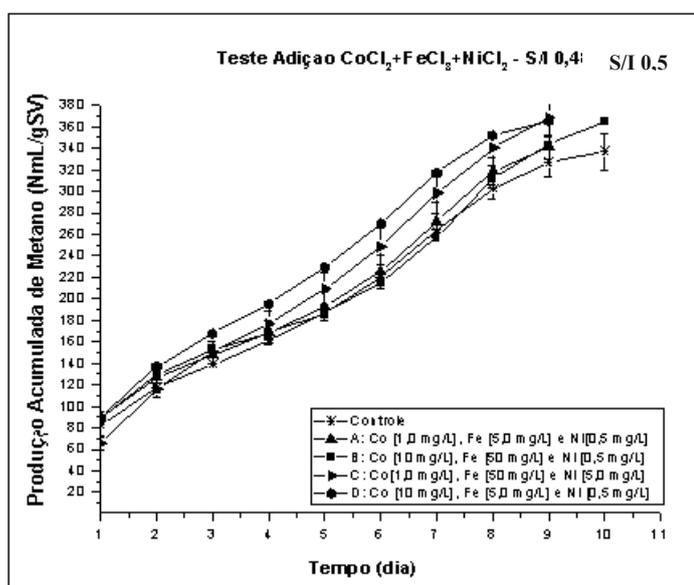
Na combinação 6-C:  $\text{CoCl}_2$  [1,0 mg/L],  $\text{FeCl}_3$  [50,0 mg/L] e  $\text{NiCl}_2$  [5,0 mg/L] verificou-se volume médio de metano de 484,1 NmLCH<sub>4</sub>/gSV (inferior ao valor do frasco-controle com 487,85 NmLCH<sub>4</sub>/gSV). Este resultado sugere que as concentrações do  $\text{FeCl}_3$  [50,0 mg/L] e do  $\text{NiCl}_2$  [5,0 mg/L] tiveram efeito tóxico para a comunidade microbiana nessa relação S/I de 1,5. Quando se compara as combinações 6-B com 6-C, verifica-se que ambos receberam as mesmas concentrações de  $\text{FeCl}_3$  [50,0 mg/L], sugerindo que essa concentração foi desfavorável para a comunidade microbiana (Figura 7-2 (e)). No geral, os resultados do teste 6 indicaram que a adição dos metais foi benéfica e resultou em incremento na produção de metano, mas quando foram testadas as menores concentrações dos elementos traço (combinação A).

No teste 7, onde testou-se a combinação dos elementos traço: Mo, Fe e Ni e razão S/I de 0,5, verificou-se que o maior volume médio de metano produzido (345,5 NmLCH<sub>4</sub>/gSV) foram nos frascos da combinação B:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}$  [5,0 mg/L],  $\text{FeCl}_3$  [50,0 mg/L] e  $\text{NiCl}_2$  [0,5 mg/L]. Esta produção de metano representou um incremento de apenas 21,5% em relação ao frasco-controle (333,2 NmLCH<sub>4</sub>/gSV), próximo de 27,82% (3-D) de incremento de metano observado quando adicionou o molibdênio em separado. Quando se observa os resultados do teste 7-D:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}$  [5,0 mg/L],  $\text{FeCl}_3$  [5,0 mg/L] e  $\text{NiCl}_2$  [0,5 mg/L], verifica-se que houve a menor produção de metano 337,1 NmLCH<sub>4</sub>/gSV. Essas condições podem estar diretamente associadas à razão substrato: inóculo de 0,5 (S/I 0,5), ou seja, menor quantidade de substrato

adicionada em relação ao inóculo, bem como a heterogeneidade do substrato que pode resultar em condições diferenciadas para cada ensaio (Figura 7-3 (f)).

No teste 8, razão substrato S/I 1,5, na combinação D:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}$  [5,0 mg/L],  $\text{FeCl}_3$  [5,0 mg/L] e  $\text{NiCl}_2$  [0,5 mg/L] houve maior produção de metano com 521,5  $\text{NmLCH}_4/\text{gSV}$  representando um incremento de 54,80% em relação ao frasco-controle (326,7  $\text{NmLCH}_4/\text{gSV}$ ). No teste 8-B a produção de metano foi de 459,95  $\text{NmLCH}_4/\text{gSV}$ , com incremento no rendimento de metano de 48,25  $\text{NmL/gSV}$ , inferioro a combinação D. A diferença entre estes testes foi na concentração de ferro (menor para a combinação D- 0,5 mg/L), sugerindo que o aumento na dosagem teve efeito negativo. O mesmo pode ser verificado para a combinação C ( $\text{Mo}$  0,5 mg/L;  $\text{Fe}$  50.0 mg/L e  $\text{Ni}$  5.0 mg/L), onde observou-se produção de metano de 469,85  $\text{NmLCH}_4/\text{gSV}$ , quase similar à combinação 8-B e inferior a produção de metano média dos frascos 8-D, sugerindo que estas concentrações de ferro e níquel (em combinação) podem ter resultado em efeito negativo para a comunidade microbiana envolvida na digestão anaeróbia (figura 7-3 (g)). No geral os resultados do teste 8, mostraram que a adição da combinação de molibdênio, ferro e níquel tiveram efeito positivo e significativo, resultando na produção de metano na maior relação S/I (1,5), o que não foi verificado na menor relação S/I testada (0,5).

(d)



e)

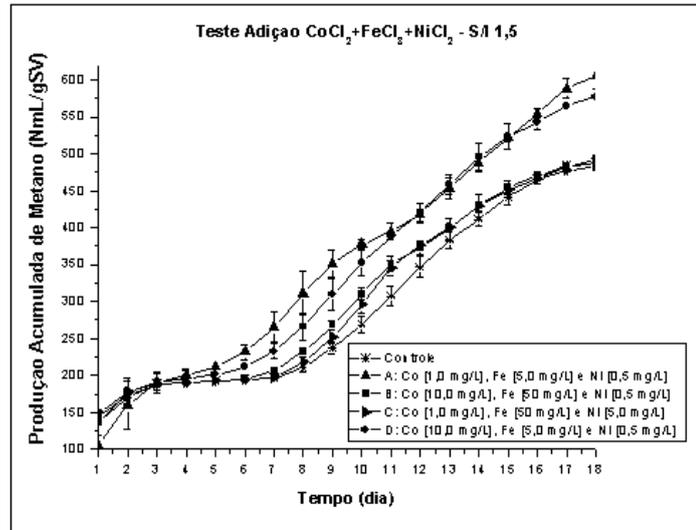
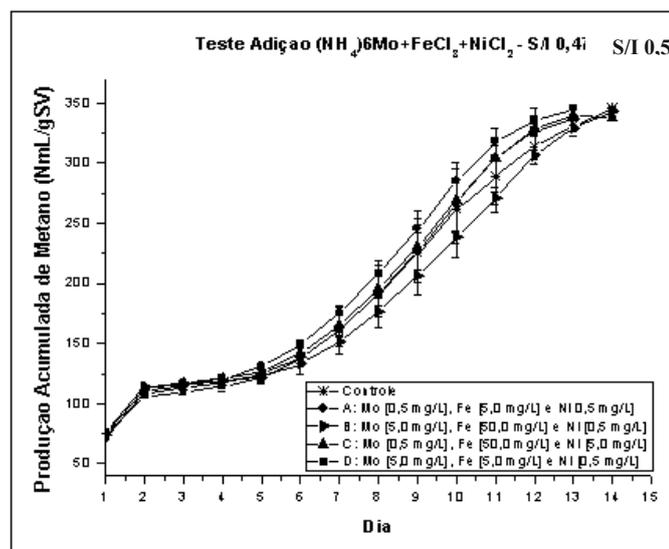
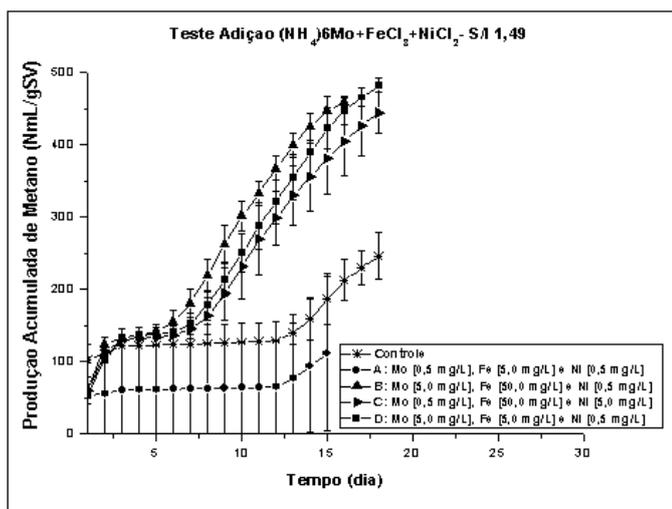


Figura 7-2 - Produção acumulada de metano nos testes com as combinações de Co+Fe+Ni para as razões substrato inóculo de S/I 0,5 (d) e 1,5 (e)

(f)



(g)



**Figura 7-3** - Produção acumulada de metano nos testes com as combinações Mo+Fe+Ni - para as razões substrato: inóculo de S/I 0,5 (f) e 1,5 (g)

### 7.3.2 Incremento de $\text{CH}_4$

Os resultados de incremento na produção de metano para todos os 6 testes realizados, estão apresentados na Tabela 7-4.

**Tabela 7-4.** Taxa máxima de produção de metano, % de aumento na produção de metano para os ensaios realizados e BMP (em negrito, destacam-se as condições que apresentaram as maiores % de aumento de metano em relação ao controle).

Teste	S/I	Condição (elemento traço em separado ou em combinação, em mg/L)	Taxa máxima de produção de CH <sub>4</sub> (NmL/gSV/dia)	Incremento na produção de CH <sub>4</sub> (%)	Incremento no rendimento de CH <sub>4</sub> em relação ao controle (NmL/gSV)
1	<b>0,5</b>	<b>A: FeCl<sub>3</sub> [5,0 mg/L]</b>	<b>18,53</b>	<b>34,13%</b>	<b>48,10</b>
1	0,5	B: FeCl <sub>3</sub> [25 mg/L]	17,11	23,8%	31,26
1	0,5	C: FeCl <sub>3</sub> [250,0 mg/L]	16,01	15,8%	33,02
1	0,5	D: FeCl <sub>3</sub> [2500,0 mg/L]	1,15	Não houve	6,20
1	0,5	E: Controle (S/I 0,5)	13,82	-	31,20
2	<b>0,5</b>	<b>A: CoCl<sub>2</sub> [1,0 mg/L]</b>	<b>19,48</b>	<b>15,7%</b>	<b>40,25</b>
2	0,5	B: CoCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]	18,5	9,9%	39,14
2	0,5	C: CoCl <sub>2</sub> [10,0 mg/L]	17,38	3,2%	38,53
2	0,5	D: Frasco-controle (S/I 0,5)	16,84	-	38,57
3	<b>0,5</b>	<b>A: (NH<sub>4</sub>) 6Mo [50,0 mg/L]</b>	<b>48,9</b>	<b>26,35%</b>	9,25
3	0,5	<b>B: (NH<sub>4</sub>) 6Mo [15,0 mg/L]</b>	<b>44,85</b>	<b>15,9%</b>	13,88
3	0,5	C: (NH <sub>4</sub> ) 6Mo [5,0 mg/L]	39,3	1,55	<b>28,77</b>
3	0,5	D: (NH <sub>4</sub> ) 6Mo [0,5 mg/L]	43,0	11,1%	<b>27,82</b>
3	0,5	E: Frasco-controle (S/I 0,5)	38,7	-	26,90
4	0,5	A: NiCl <sub>2</sub> [0,25 mg/L]	18,31	1,2%	40,35
4	0,5	B: NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	20,49	6,85%	42,57
4	0,5	C: NiCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L]	<b>24,68</b>	<b>16,3%</b>	<b>46,33</b>
4	0,5	D: NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]	23,82	8,8%	43,35
4	0,5	E: Frasco- controle (S/I 0,5)	19,41	-	39,84
5	0,5	A:CoCl <sub>2</sub> [1mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [5mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	32,07	4,8	58,71
5	0,5	B:CoCl <sub>2</sub> [10mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [50mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	31,87	4,2	61,55
5	0,5	<b>C:CoCl<sub>2</sub>[1mg/L]+FeCl<sub>3</sub>[50mg/L]+NiCl<sub>2</sub> [5 mg/L]</b>	<b>40,39</b>	<b>32,0</b>	<b>63,70</b>
5	0,5	D: CoCl <sub>2</sub> [10 mg/L]+ FeCl <sub>3</sub> [5 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	37,47	22,5	61,60
5	0,5	E:Frasco-controle (S/I 0,5)	30,58	-	56,56
6	<b>1,5</b>	<b>A:CoCl<sub>2</sub>[1mg/L]+FeCl<sub>3</sub>[5mg/L]+NiCl<sub>2</sub> [0,5 mg/L]</b>	<b>50,22</b>	<b>64,1%</b>	<b>62,64</b>
6	1,5	B:CoCl <sub>2</sub> [10mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [50mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	32,90	7,5%	50,60
6	1,5	C:CoCl <sub>2</sub> [1mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [50mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [5 mg/L]	37,44	22,35	49,75
6	1,5	D: CoCl <sub>2</sub> [10 mg/L]+ FeCl <sub>3</sub> [5 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	35,40	15,6%	59,67
6	1,5	E: Frasco-controle (S/I 1,5)	30,60	-	50,15
7	0,5	A:(NH <sub>4</sub> )6Mo[0,5 mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	31,07	2%	21,48
7	0,5	B: (NH <sub>4</sub> )6Mo[5,0 mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	28,69	Não houve	21,50
7	0,5	C: (NH <sub>4</sub> )6Mo[0,5 mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]	30,26	Não houve	21,21
7	0,5	D: (NH <sub>4</sub> )6Mo[5,0 mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	31,46	3,28%	20,93

7	0,5	E: Frasco-controle (S/I 0,5)	30,46	-	20,6
8	1,5	A: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo[0,5 mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [5,0 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L]	30,69	61,18%	44,99
8	1,5	<b>B: (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo[5,0 mg/L]+FeCl<sub>3</sub> [50,0 mg/L]+NiCl<sub>2</sub> [0,5 mg/L]</b>	<b>32,35</b>	<b>69,90%</b>	<b>48,25</b>
8	1,5	C: (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo[0,5 mg/L]+FeCl <sub>3</sub> [50,0 mg/L]+NiCl <sub>2</sub> [5,0 mg/L]	28,81	51,31%	49,30
8	1,5	<b>D: (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo[5,0 mg/L]+FeCl<sub>3</sub> [5,0 mg/L]+NiCl<sub>2</sub> [0,5 mg/L]</b>	<b>32,23</b>	<b>69,27%</b>	<b>54,80</b>
8	1,5	E: Frasco-controle (S/I 1,5)	19,04	-	34,01

A partir da Tabela 7-4 pode-se observar que os maiores valores de incremento na produção de metano (em %) foram obtidos para os testes 1 (adição de cloreto férrico em separado na menor concentração avaliada: [5,0mg/L] e 5 (adição dos elementos traço na combinação C:CoCl<sub>2</sub> [1mg/L] + FeCl<sub>3</sub>[50 mg/L] + NiCl<sub>2</sub> [5 mg/L], nas maiores concentrações de ferro e níquel), ambos com relação S/I de 0,5, evidenciando o efeito benéfico da adição dos elementos traço para a comunidade microbiana e, conseqüentemente resultando em maior produção de metano na DA a partir do resíduo alimentar. Não obstante, para o teste 6, razão S/I de 1,5, o maior incremento e taxa de produção de metano foi observado na combinação A (CoCl<sub>2</sub>[1,0 mg/L] + FeCl<sub>3</sub> [5mg/L] + NiCl<sub>2</sub> [0,5 mg/L]), sugerindo que para maiores razões de S/I, a adição dos elementos traço tiveram efeito positivo nas menores concentrações testadas.

Comparando os testes 5 e 6, que diferiram na razão S/I (0,5 e 1,5), com adição de cobalto, ferro e níquel, verificou-se que as semelhantes combinações de elementos traço foram benéficas na produção de metano, sugerindo que houve um requerimento dos micro-organismos pelos elementos, ‘capturados’ como cofatores enzimáticos.

Com relação aos testes 7 e 8, onde foram adicionados a combinação dos elementos traço molibdênio, ferro e níquel em diferentes concentrações (diferindo dos testes 5 e 6 pela substituição do Cobalto), verificou-se que a adição dos elementos traço nas diferentes concentrações para a razão S/I de 0,5 teve efeito marginal com baixíssima produção de metano, cerca de 2 e 3,2% de incremento na produção de metano para a combinação A e D, respectivamente, e a maior taxa máxima de produção de metano de 31,46 NmL/gSV/dia comparado com o controle com 30,46 NmL/gSV/dia, conforme Tabela 7-4. Entretanto, os testes 7-A e 7-D (S/I 0,5) apresentaram as maiores taxas de produção de metano com 31,07% e 31,46%, respectivamente. Não obstante, a adição desses metais no teste 8, quando foi testada a razão S/I de 1,5, resultou em efeito consideravelmente positivo, superior aos testes anteriores. Houve um incremento na produção de metano para as combinações 8-B e 8-D,

com 69,90% e 69,27%, respectivamente. A taxa máxima de produção de metano, também teve os maiores resultados nos testes B e D, corroborando com o incremento de metano produzido.

Quando se compara os testes 6 (Co, Fe e Ni) e 8 (Mo, Fe e Ni), que diferiram entre si pela substituição do cobalto pelo molibdênio, verificou-se que as mesmas concentrações de Fe e Ni (combinações A e A dos testes 6 e 8), o maior incremento na produção de metano foi encontrado no teste 8-D com 69,27% e taxa máxima de produção de metano de 32,23 NmL/gSV/dia; seguido do teste 6-A com 64,1% de incremento na produção de metano e 50,22 NmL/gSV/dia de taxa máxima; seguido ainda do teste 8-A com incremento na produção de metano de 61,18%, e taxa máxima de 30,69 NmL/gSV/dia. No teste 6-D, o incremento na produção de metano foi significativamente menor (15,6%), quando comparado com o teste 6-A (64,1%), e taxa de produção de metano de 35,4 NmL/gSV/dia. Esses resultados indicam que a adição de molibdênio em todos os testes (8-A, B, C e D), teve efeito consideravelmente maior e favorável comparado com o cobalto, conforme observado com os valores no incremento de rendimento de metano e das taxas máximas de produção de metano, e esses comparados com seus respectivos testes controles (Tabela 7-4).

Comparando a adição dos elementos traço em separado, verificou-se que a adição de ferro e de níquel dos testes que tiveram os maiores incrementos no rendimento de metano foram os que obtiveram as maiores taxas de produção de metano, a partir do resíduo alimentar (teste 1A, com 48,10 NmL/gSV de rendimento e incremento de 34,13% e teste 4C, com 46,33 NmL/gSV de rendimento e incremento de metano de 16,3% (Tabela 7-4).

Os elementos traço ferro, cobalto, níquel e molibdênio têm sido estudados por vários pesquisadores, porque podem alcançar efeitos favoráveis de estabilização na DA com tratamento de vários tipos de resíduos orgânicos, tais como: resíduo alimentar (ZHANG *et al.*, 2015), palha de milho (KHATRI *et al.*, 2015), palha de trigo (SCHMIDT *et al.*, 2014).

No trabalho de Banks *et al.* (2012), os autores também utilizaram combinação de ferro [5,0 mg/L], cobalto [1,0 mg/L], níquel [1,0 mg/L], selênio [0,2 mg/L], zinco [0,2 mg/L] em teste com digestão anaeróbia tratando resíduo alimentar, e verificaram incremento na produção de metano de 58%. O teste 6, combinação A (tabela 7-4), também foi utilizado concentrações semelhantes para ferro e cobalto, divergindo do níquel com menor concentração; com os elementos adicionados obteve-se rendimento de metano de 62,64%. Não se pode confirmar se a adição desses elementos traço adicionados por Banks *et al.* (2012) também aumentaria o

rendimento de metano para o teste 6. Entretanto é conhecido que as vias da metanogênese dependem da enzima redutase metil-CoM, que depende do cofator F<sub>430</sub> contendo níquel (DEY *et al.*, 2010). Desta forma, muitas hidrogenases possuem um centro com níquel e quando requeridos pelos micro-organismos são biodisponibilizados completando a formação de metano (THAUER *et al.*, 2010).

Schmidt *et al.* (2014) verificaram em dois reatores tratando palha de trigo, que quando adicionaram níquel [0,7 mg/L] e ferro [100 mg/L] houve acúmulo de ácidos orgânicos, indicando que a adição desses elementos traço sozinhos não foi suficiente para a estabilidade do processo. Quando houve adição da mistura de níquel [0,5-0,7 mg/L], cobalto [2,0-11,0 mg/L], molibdênio [0,7 mg/L] e tungstênio, obteve-se efeito na degradação dos ácidos orgânicos e, conseqüentemente, incremento na produção de metano de 60 e 56% em cada reator. Comparando esses resultados com aqueles obtidos no presente trabalho; no teste 1, ensaio A com adição de [5,0 mg/L] de ferro sozinho, obteve-se um incremento no rendimento de metano de 48,10% (em relação ao frasco-controle); e quando adicionado cobalto e níquel houve aumento no rendimento de metano, conforme os testes 5 (A e D) S/I 0,5, e 6 (A e D) S/I 1,5, com 58,71%, 61,60%, 62,64% e 59,67%, respectivamente. No teste 5A o aumento no rendimento de metano ocorreu de forma sutil, com resultado próximo do controle (56,56%). O ferro participa na estrutura dos citocromos C que são proteínas de membrana que estão envolvidas na cadeia de transporte de elétrons nos micro-organismos e, portanto, a adição deste elemento traço em pequena concentração, aumenta a produção de metano (MADIGAN *et al.*, 2016).

Zhang *et al.* (2015) em sistema tratando resíduo alimentar, também adicionaram as mesmas concentrações de cobalto 1,0 mg/L, níquel 5,0 mg/L, com aumento de ferro 100 mg/L, resultando em um rendimento de 504 mLCH<sub>4</sub>/gSV, e um incremento de metano de 35,5%. Essas concentrações foram semelhantes ao teste 6, ensaio C (tabela 7-4), com exceção do ferro que teve uma concentração menor de 50,0 mg/L. Entretanto, não houve incremento no rendimento de metano em decorrência do BMP ter sido abaixo do valor do frasco-controle, além disso as elevadas concentrações de ferro tiveram efeito inibitório para a comunidade microbiana. Para Schmidt *et al.* (2014) concentrações de 100 mg/L de ferro também não foram benéficas levando a falhas no processo de DA.

Moested *et al.* (2015) em sistema tratando a fração orgânica de resíduo sólido urbano, adicionaram uma concentração mais baixa de cobalto de 0,5 mg/L e a mesma concentração

para o níquel com 0,5 mg/L, a mesma que foi utilizada neste trabalho, e para o ferro a concentração adicionada foi superior com 400 mg/L e o incremento de metano variou de 8 a 35%. Quando Karlsson e colaboradores (2012) em sistema tratando alimento industrial, adicionaram concentrações mais reduzidas de 0,5 mg/L de cobalto, 0,5 mg/L de ferro e 0,25 mg/L de níquel obtiveram um incremento de metano de 64 e 67%, em dois sistemas de tratamento anaeróbio com a fração orgânica de resíduo sólido urbano. Cai *et al.* (2017) também adicionaram baixas concentrações de elementos traço, a exemplo, de Co [0,013 mg/L], no qual era considerada elevada para a fermentação da palha de arroz, ocasionando efeito inibitório. Evranos e Demirel (2015) quando adicionaram concentração de 0,1 mg/L de níquel tiveram um incremento no rendimento de metano de 27% em reator tratando silagem de milho. Isso indica que a adição das menores concentrações de elementos traço foi favorável para o incremento no rendimento de metano, e quando se adicionou concentrações mais elevadas, ocorreu efeito inibitório da comunidade microbiana (e conseqüentemente, não houve aumento na produção de metano e às vezes inibição).

A adição de elementos traços para a estabilidade de sistemas de DA, bem como as concentrações ideais requeridas, estão intrinsicamente, relacionadas à biodisponibilidade dos metais que depende da sua especificação química. No presente estudo, constatou-se que mesmo nas menores concentrações adicionadas de elementos traço, não houve problema de biodisponibilidade do metal, talvez porque o frasco-reator era pequeno e de mistura completa com agitação. Então, no presente estudo os elementos metálicos adicionados estavam disponíveis, e provavelmente foram consumidos pelos micro-organismos resultando no incremento de metano observado. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a adição de ferro (5.0mg/L), e níquel (1.0mg/L) em separado e a adição da combinação (Co, Fe, e Ni, nas concentrações 1,0; 5,0; e 0,5 mg/L, respectivamente) foram benéficas para produzir incremento no BMP a partir do resíduo alimentar.

### 7.3.3 Composição e Diversidade da Comunidade Microbiana Determinado por Sequenciamento Massivo

A partir dos resultados de produção de metano com a adição dos elementos traço, escolheu-se as amostras dos testes 5 e 6 (com cobalto, ferro, níquel e molibdênio) para realizar a investigação da comunidade microbiana usando sequenciamento de nova geração na plataforma Ion Torrent.

### Diversidade Microbiana

O sequenciamento na plataforma IonTorrent gerou 884,706 reads por amostra, com uma baixa redução para ~ 848,883 reads, com tamanho médio das sequências de 200 pb após o processo de limpeza, com remoção de quimeras. Na tabela 7-5 apresentam-se os índices de Shannon-H, Simpson's, dominância, o número de sequências e OTU's de cada amostra (controles e ensaios com combinações de elementos traço S/I 0,5 e 1,5).

**Tabela 7-5.** Índices de diversidade e riqueza e número de OTU's identificadas em cada

Testes/Amostra	Número de OTUs	Número de reads	Shannon-H	Simpson's (1-D)	Dominância (D)	Chao 1
5-Controle S/I 0,5	2182	52518	5,859	0,9905	0,009	2724
5-A: S/I 0,5	2104	57107	5,775	0,9895	0,010	2476
5-B: S/I 0,5	2274	62804	5,850	0,9900	0,010	2785
5-C: S/I 0,5	2376	70317	5,936	0,9915	0,008	2821
5-D: S/I 0,5	2291	71136	5,866	0,9901	0,009	2699
6-Controle S/I 1,5	2282	61273	5,863	0,9914	0,008	2795
6-A: S/I 1,5	2776	150547	5,924	0,9893	0,010	3104
6-B: S/I 1,5	2521	92607	5,848	0,9904	0,009	2974
6-C: S/I 1,5	2475	73346	5,977	0,9920	0,007	2865
6-D: S/I 1,5	2438	73638	5,902	0,9907	0,009	2862

amostra pela análise IonTorrent

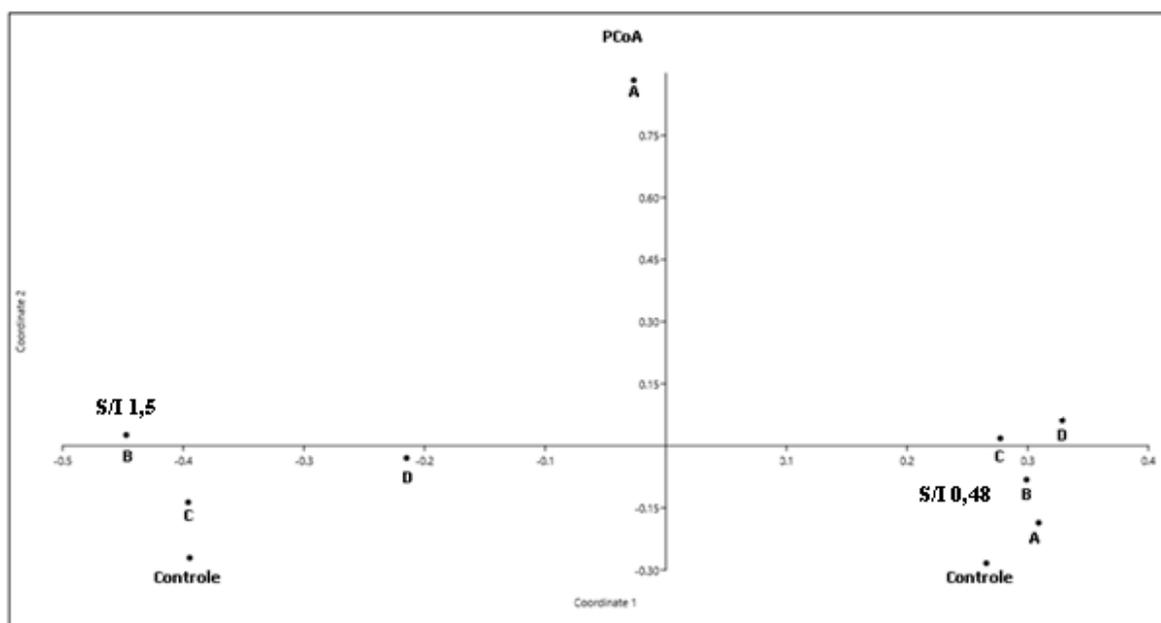
Nota: Teste <sup>b</sup>5(S/I = 0,5) e <sup>b</sup>6 (S/I =1,5). As concentrações dos elementos traço foram (em mg/L): A: CoCl<sub>2</sub>[1]+FeCl<sub>3</sub>[5]+NiCl<sub>2</sub> [0,5], B: CoCl<sub>2</sub>[10]+FeCl<sub>3</sub>[50]+NiCl<sub>2</sub> [0,5], C: CoCl<sub>2</sub>[1]+FeCl<sub>3</sub>[50]+NiCl<sub>2</sub> [5] e D: CoCl<sub>2</sub>[10]+FeCl<sub>3</sub> [5]+NiCl<sub>2</sub> [0,5]. Controle: amostra coletadas dos frascos sem adição de elemtnos traço.

O índice de Simpson's no geral indicou baixa variação de uma amostra para outra, assim como o índice de Shannon no teste 5 (controle, B e C) foram quase semelhantes. Na prática, quanto maior o valor do índice de Shannon, maior a diversidade da amostra. Magurran (1988) assume para o índice de Shannon valores que situam entre 1,5 e 3,5, que raramente ultrapassam o valor de 4,5, indicando que as amostras possuem ampla diversidade. O número de reads (abundância) e de OTU's (riqueza) variaram das amostras dos controles para os testes com adição de metais com aumento, tanto para a S/I 0,5, quanto 1,5. Isto sugere que a adição de elementos traço influenciou no desenvolvimento da comunidade microbiana (e favoreceu no aumento da riqueza). Para as amostras do teste 5, S/I 0,5, amostras 5A e 5B apresentaram valores de dominância semelhantes. No teste 6, S/I 1,5, houve semelhança na dominância entre as amostras.

O índice de similaridade PCoA de Bray-Curtis em suas duas principais coordenadas (coordinate 1 e coordinate 2) revelou diferenças na diversidade da comunidade microbiana

das amostras investigadas (Figura 7-4). Para as amostras do teste 5 (S/I 0,5), essas estiveram próximas, entretanto o controle (sem adição de elementos traço) diferenciou-se das amostras com adição de elementos traço.

Quando houve aumento da relação substrato/inóculo para 1,5, (teste 6) diferenças na diversidade da comunidade microbiana foram nítidas, nas distintas amostras com diferentes concentrações de elementos traço, no qual a amostra do teste 6-A é diferente de todas as amostras, 6-A e 6-D diferem das outras amostras (6-controle, 6-B e 6-C). Em suma, a adição de elementos traço no teste 6 com razão S/I de 1,5 alterou na diversidade e composição da comunidade microbiana, uma vez que as amostras se diferenciaram entre si (conforme Figura 7.4).



**Figura 7-4.** Análise das Coordenadas Principais (PCoA) da diversidade microbiana. As duas principais coordenadas (PCoA, coordinate 1 e coordinate 2) do índice de similaridade de Bray-Curtis plotados de cada amostra. Terceiro e quarto quadrantes estão dispostos os ensaios 6-controle (controle), 6-A (A), 6-B (B), 6-C (C) e 6-D (D) com razão S/I de 1,5; assim também foram dispostos no primeiro e segundo quadrante os ensaios 5-controle (controle), 5-A (A), 5-B (B), 5-C (C) e 5-D (D) com razão S/I de 0,5.

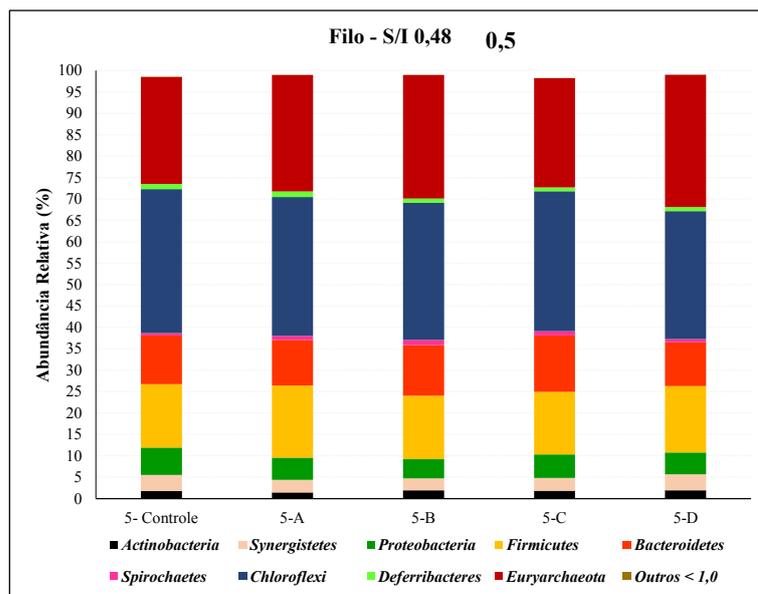
#### Composição da Comunidade Microbiana

A maior parte dos estudos com adição de elementos traço investigaram o efeito de diferentes concentrações e combinações na produção de metano, com raro enfoque sobre a comunidade microbiana. Neste estudo, investigou-se o efeito da adição de diferentes concentrações de cobalto, ferro e níquel, e da razão substrato:inóculo (0,5 e 1,5), sobre a comunidade microbiana de bactérias e arqueias.

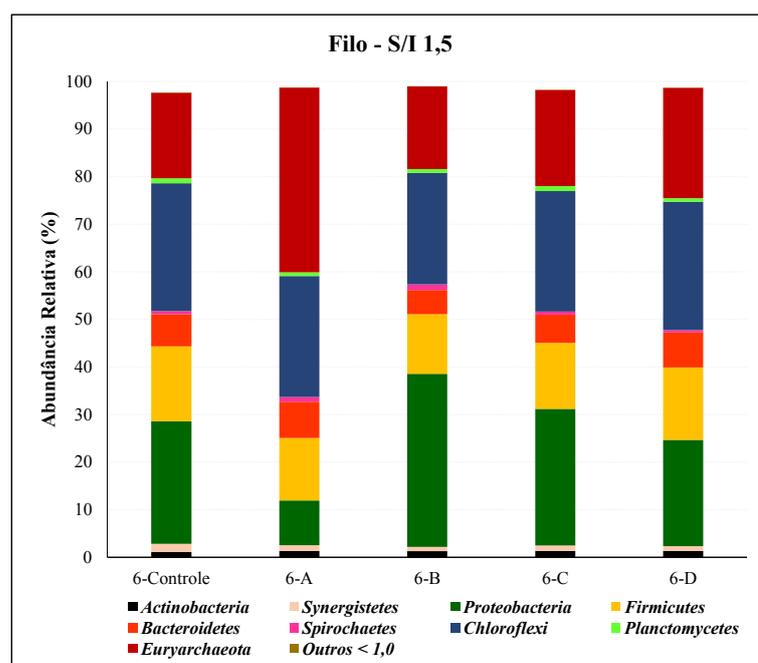
A análise de sequenciamento revelou a presença de nove filos com abundância relativa > 1,0% para as razões S/I 0,5 e 1,5 em pelo menos uma das amostras. Os outros filos (26), com abundância relativa < 1,0% foram agrupados como ('outros') (Figura 7-5). Os principais filos detectados para a razão S/I 0,5 (teste 5) em ordem decrescente foram *Chloroflexi* (29-33%), *Euryarchaeota* (25-30%), *Firmicutes* (14-16%) e *Bacteroidetes* (10-13%). Juntos estes quatro filos contribuíram com aproximadamente 86% da diversidade microbiana observada em todas as amostras. Enquanto para a razão S/I 1,5 (teste 6) os principais filos encontrados em ordem decrescente foram *Proteobacteria* (9-36%), *Euryarchaeota* (17-38%), *Chloroflexi* (25%) e *Firmicutes* (15%). Juntos os quatro filos contribuíram com 96% de diversidade microbiana observada em todas as amostras. No ensaio 5, com razão S/I 0,5, os resultados do sequenciamento mostraram que não houve alterações da composição da comunidade microbiana em nível de filo de uma amostra para outra, indicando que a adição dos elementos traço não alterou a comunidade. Entretanto, para o ensaio 6 (razão S/I 1,5), verificou-se mudanças na composição da comunidade microbiana em função da adição dos elementos traço, sobretudo na abundância relativa dos filos *Proteobacteria* e *Euryarchaeota* (Figura 7-5).

Em *Chloroflexi*, a classe *Anaerolineae*, a ordem *Anaerolineales* era abundante em todas as amostras. Entretanto nas amostras do teste 6 (S/I 1,5) houve diminuição na proporção, quando comparado com o teste 5 (S/I 0,5). Esses micro-organismos são constituídos por bactérias anaeróbias, mesofílicas ou moderadamente termofílicas, filamentosos, quimiorganotróficos (utilizam carboidratos, aminoácidos ou peptídeos). Algumas crescem somente, quando estão em simbiose com outros micro-organismos. Normalmente, decrescem com aumento de carga orgânica (NARIHIRO *et al.*, 2008), conforme observado. O principal gênero *Bellilinea* teve aumento no teste 6-D (S/I 1,5), enquanto *Syntrophace* reduziram, ambas bactérias simbióticas (figura 7-6). *Bellilinea* são degradadoras de ácidos orgânicos que atuam em simbiose com arqueias metanogênicas do gênero *Methanosaeta*. Provavelmente, atuaram em sinergia com simbiose no teste 6 (YAMADA *et al.*, 2015).

(A)



(B)



**Figura 7-5.** Composição da comunidade microbiana em nível de filo. OTUs com abundância relativa < 1% em cada amostra foram incluídas no grupo 'Outros'. (a) Ensaio 5 (razão S/I 0,5), e (b) ensaio 6 (razão S/I 1,5). Para todos os ensaios 5 e 6, as letras representam as combinações dos elementos traços. A: Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; B: Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; C: Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L] e Ni [5,0 mg/L]; D: Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]. Os controles continuam inóculo e substrato (sem adição de elemento-traço).

Dentro do Filo *Firmicutes*, a ordem *Clostridiales* (família *Clostridiaceae*) é bastante diversificada, com bactérias capazes de degradar proteínas, lipídeos e carboidratos complexos,

são frequentemente encontradas em reatores anaeróbios (SUNDBERG *et al.*, 2013; ZHANG e ANGELIDAKI *et al.*, 2014). O gênero *Clostridium* é composto por bactérias que têm uma demanda maior por ferro, no qual são requeridos pelo citocromo c na respiração celular (De VOS *et al.*, 2009). Para os ensaios 5 (S/I 0,5) e 6 (S/I 1,5), a adição de elementos traço (ferro) não alterou a abundância de *Clostridium*, pois os valores ficaram próximos do frasco-controle. Esses micro-organismos são responsáveis pela fermentação e produção de álcool e ácidos orgânicos, como acetato e butirato (DWORKIN, 2006). O gênero *Sporomusa* (ordem *Clostridiales*, família *Veillonellaceae*) era presente em todas as amostras com baixa abundância relativa em S/I 0,5, presentes também na situação S/I 1,5 com abundância relativa < 1,0%. Esses micro-organismos utilizam a rota acetil-CoA como aceptores de elétrons para a conservação de energia. A oxidação de uma variedade de substratos é canalizada para a síntese redutora de acetato e CO<sub>2</sub>.

Para os ensaios 6 (S/I 1,5) surgiram dois diferentes grupos *Burkholderiales* (*Comamonadaceae*, *Comamonas*), e *Pseudomonadales*. A ordem *Burkholderiales* apresentou aumento em sua abundância relativa nos ensaios 6-B e 6-C, quando foi adicionada a maior concentração de Fe [50,0 mg/L], em relação a abundância relativa encontrada nos testes 6-A e 6-D quando a menor concentração de Fe [5,0 mg/L] foi adicionada (figura 7-6 (b)). A ordem *Burkholderiales* é bastante diversificada (alguns membros são bactérias capazes de realizar a desnitrificação), com micro-organismos anaeróbios facultativos, quimiolitotróficos, doadores de elétrons de ferro (BRENNER *et al.*, 2004).

A ordem *Pseudomonadales* apresentou grande aumento de abundância relativa no ensaio 6-D quando foi adicionado maior concentração de Co [10,0 mg/L], e diminuição nos ensaios 6-A e 6-C quando adicionada menor a concentração de Co [1,0 mg/L] (Figura 7-6 (b)). Esses micro-organismos são quimioorganotrófico aeróbios, vários micro-organismos possuem requisitos complexos como fator de crescimento, enquanto outros crescem em meio definido simples contendo uma única fonte de carbono como energia.

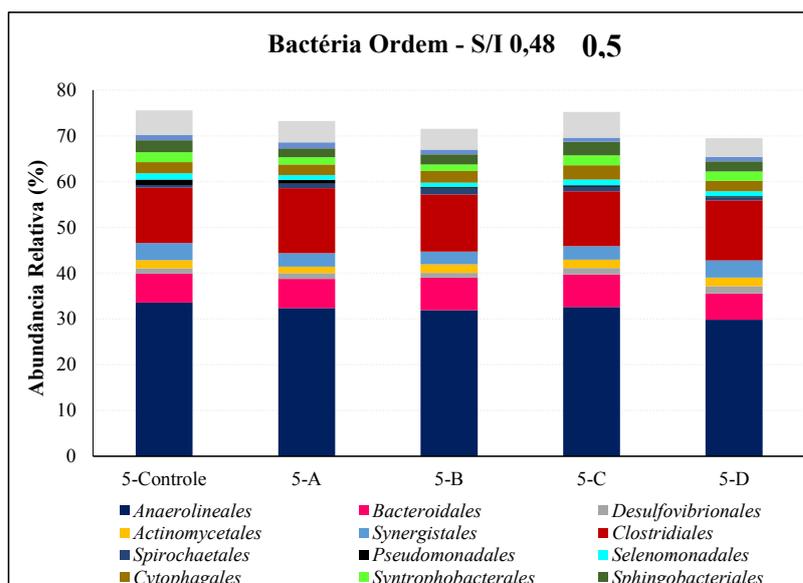
Para os testes com razão S/I 1,5 (teste 6), houve predominância de *Comamonadaceae*, e este grupo aumentou em abundância no ensaio 6-B quando adicionada a maior concentração de ferro [50,0 mg/L]; e redução da abundância nos testes 6-A e 6-D que receberam as menores dosagens de Fe [5,0 mg/L] (figura 7-7 (d)). *Comamonadaceae* são comumente encontradas em sistemas de tratamentode esgoto, possuem micro-organismos desnitrificantes. O principal

gênero, *Comamonas* cresce bem quando contém ácidos orgânicos, aminoácidos ou peptonas presentes no ambiente, pouco carboidrato é usado (BRENER *et al.*, 2004).

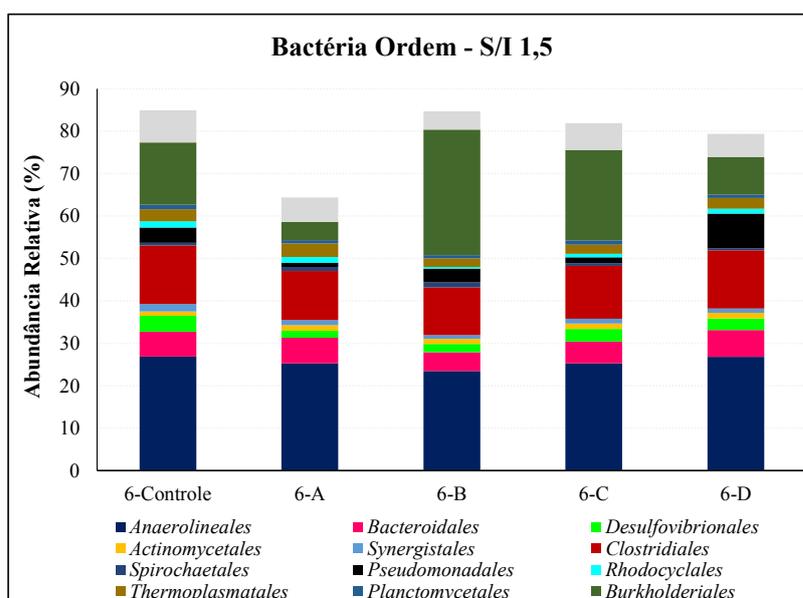
*Alcaligenaceae* teve um aumento nos testes 6-B e 6-C com a maior concentração de Fe [50,0 mg/L], e diminuição no teste 6-A com redução de Fe [5,0 mg/L] (figura 7-7 (d)). *Pseudomonadales* também teve aumento no teste 6-D com aumento de Co [10,0 mg/L], e diminuição nos testes 6-A e 6-C quando reduziu Co [1,0 mg/L] (Figura 7-6 (b)). Esses micro-organismos também contêm desnitrificantes e degradadoras de diferentes compostos orgânicos, e *Alcaligineaceae* que esta dentro da ordem *Burkholderiales* tem várias que são desnitrificantes e degradadoras de compostos orgânicos como fenol e outros hidrocarbonetos aromáticos. Esses micro-organismos podem utilizar o nitrato ou o nitrito como alternativa de aceptores de elétrons para o crescimento, quando ocorre anaerobiose (BRENNER *et al.*, 2004).

Comparando os testes 5 e 6, com diferentes razões de S/I 0,5 e de 1,5, verificou-se que os grupos *Desulfovibrionaceae* e *Syntrophobacterales* predominaram no teste 5 (S/I 0,5), enquanto foram detectadas em baixa abundância relativa, ou não foram detectadas (no caso de *Syntrophobacterales*, família *Syntrophaceae*) no teste 6 (S/I 1,5) (figura 7-7 (c) e (d)); sugerindo que quando se tem menor proporção de substrato em relação ao inóculo, as bactérias sintróficas são importantes e dominantes na digestão anaeróbia. Já na maior razão substrato/inóculo testada (S/I 1,5), as bactérias sintróficas foram detectadas em baixa proporção. Nesta condição (S/I 1,5), as ordens predominantes foram *Burkholderiales* e *Pseudomonadales*. Isso provavelmente deve estar relacionado às diferentes cargas orgânicas aplicadas (razão S/I), uma vez que foram utilizadas as mesmas combinações e concentrações dos elementos traços nos testes 5 e 6 (Figura 7-6 (b)).

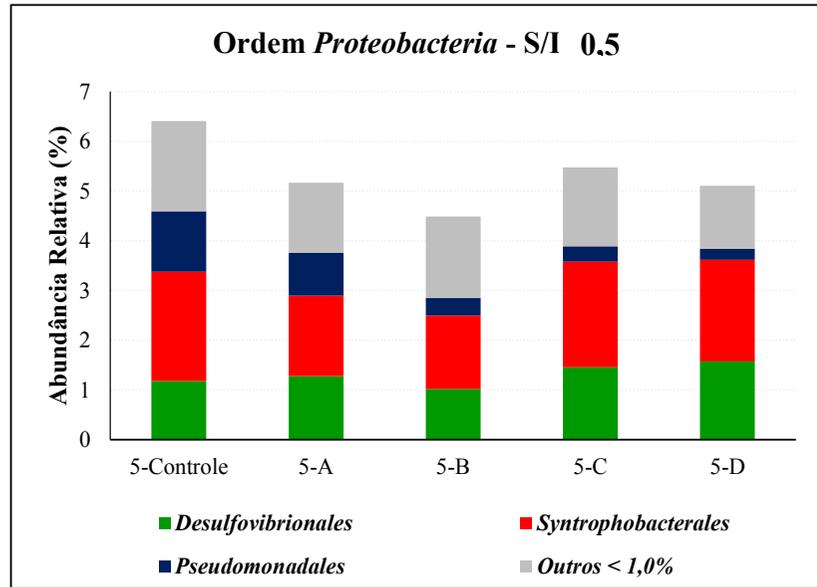
(A)



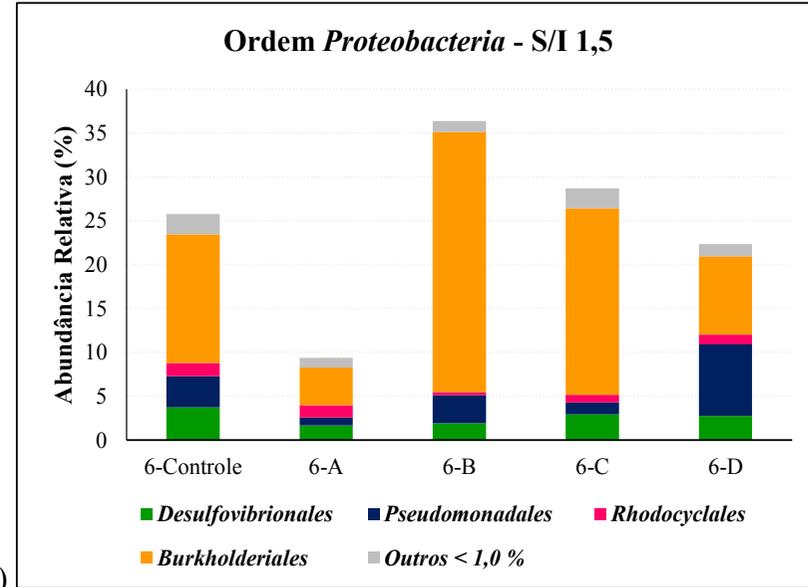
(B)



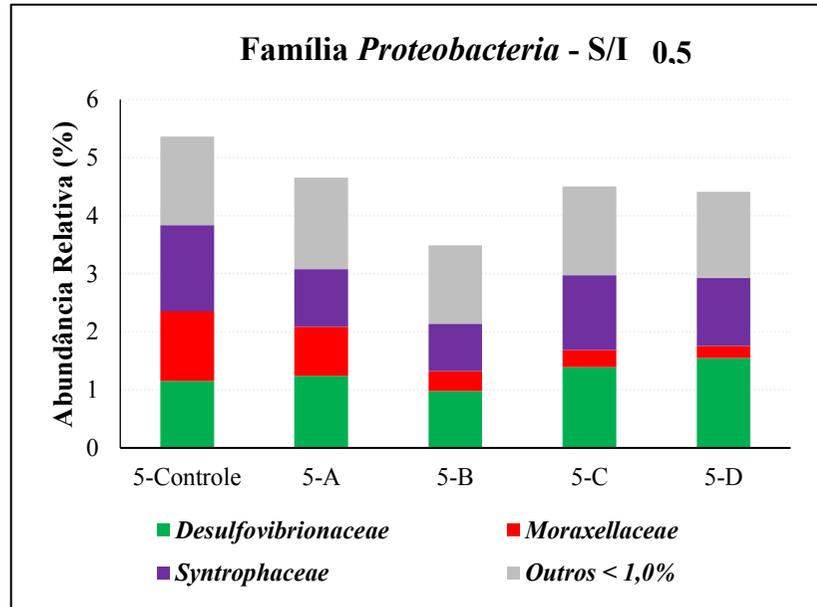
**Figura 7-6.** Composição da comunidade microbiana em nível de ordem. OTUs com abundância relativa < 1% em cada amostra foram incluídas no grupo 'Outros'. Ensaio 5 (razão S/10,5), e ensaio 6 (razão S/I 1,5). Para todos os ensaios 5 (a) e 6 (b), as letras representam as combinações dos elementos traços. A: Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; B: Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; C: Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L] e Ni [5,0 mg/L]; D: Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]. Os controles continham inóculo e substrato (sem adição de elemento-traço).



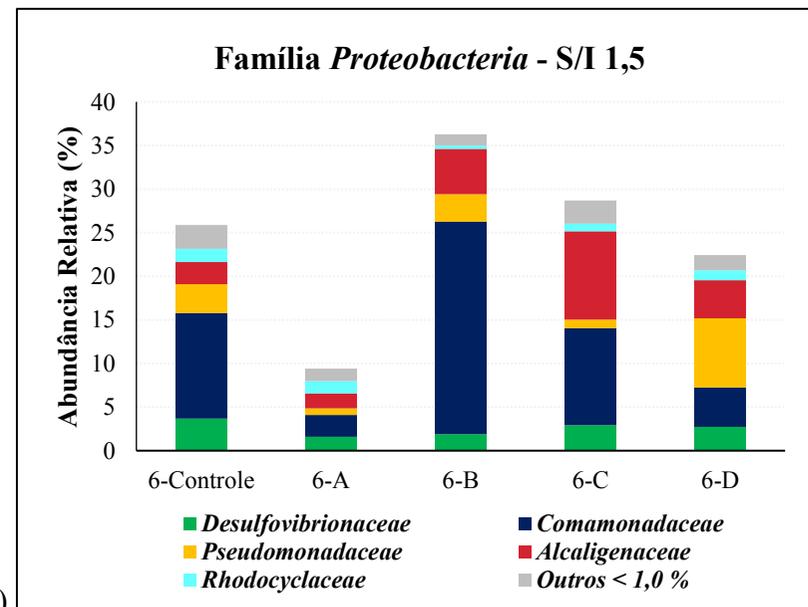
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 7-7.** Composição da comunidade microbiana em nível de ordem (a e b) e família (c e d) dentro de *Proteobacteria*. OTUs com abundância relativa < 1% em cada amostra foram incluídas no grupo 'Outros'. Teste 5 (razão S/I 0,5), e teste 6 (razão S/I 1,5). Para todos os testes 5 e 6, as letras representam as combinações dos elementos traços. A: Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; B: Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; C: Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L] e Ni [5,0 mg/L]; D: Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]. Os controles continham inóculo e substrato (sem adição de elemento-traço).

#### Composição das Arqueias Metanogênicas

O filo *Euryarchaeota* foi o segundo maior em abundância relativa com variação de 25 a 30%. Em termos de família, a comunidade de arqueias metanogênicas foi representada em todas as amostras do teste 5 (S/I 0,5) e 6 (S/I 1,5). A distribuição de sequências é mostrada na figura 7-8. Seis famílias foram detectadas com abundância relativa > 1,0% nos testes S/I 0,5, táxons com abundância relativa < 1,0% foram agrupados em 'outros'. *Methanosaeta*, *Methanospirillaceae* e *Methanobacteriaceae* foram as metanogênicas dominantes para S/I 0,5. Entretanto, não houve elevadas alterações de um teste para o outro, com exceção das amostras 5-B e 5-D que teve aumento de *Methanosaeta* e de *Methanospirillaceae*, quando adicionada idênticas concentrações de Co [10,0 mg/L] e de Ni [0,5 mg/L] na condição S/I 0,5.

Seis famílias foram observadas com abundância relativa > 1,0% nos testes S/I 1,5, táxons com abundância relativa < 1,0% foram agrupados em 'outros'. *Methanosaeta*, *Methanospirillaceae* e *Methanobacteriaceae* foram as metanogênicas dominantes semelhantes a S/I 0,5, entretanto, com variações de proporção na abundância relativa entre os testes. A exemplo dos testes 6-A, 6-C e 6-D que tiveram aumento na abundância relativa (%). *Methanospirillaceae* aumentou nos testes 6-A e 6-D quando teve as mesmas concentrações de Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L] na condição S/I 1,5. As menores concentrações de elementos traço Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L] favoreceram *Methanosaeta* e *Methanospirillaceae* (figura 7-8). Neste teste, não houve produção de butirato, favorecendo no desenvolvimento de *Methanosaeta*. Entretanto, houve propionato (2,7 mg/L) e acetato (2,3 mg/L) em baixas concentrações. *Methanosaeta* se desenvolve em baixas concentrações de acetato de 5 µM (em torno de 5 mg/L), enquanto *Methanosarcina* requerem pelo menos 1 mM de acetato para crescimento (JETTEN *et al.*, 1992). A dominância de *Methanosaeta* é indicativo de estabilidade em sistemas anaeróbios, onde as concentrações de acetato são estritamente baixas. Assim, como as atividades das metanogênicas hidrogenotróficas (*Methanospirillum*) são cruciais para a estabilidade e eficiente desempenho do processo com uso do H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e formiato como substrato para o crescimento.

*Methanospirillaceae* foi inibida com Fe [50,0 mg/L], conforme ensaios 6-B e 6-C, quando a concentração de ferro adicionada foi reduzida para [5,0 mg/L]. *Methanospirillaceae* apresentou aumento na abundância relativa nos ensaios 6-A e 6-D quando comparado ao frasco-controle (figura 7-8).

Cai *et al.* (2017), tratando palha de arroz em reatores com volume de trabalho de 200 mL, com relação S/I de 1,5 verificaram a predominância de *Methanosaeta* e *Methanobacterium*, enquanto neste estudo (degradação anaeróbia de resíduo alimentar) predominou *Methanosaeta* e *Methanospirillum*. No trabalho de Cai *et al.* (2017) a adição de elementos traço em separado alterou a composição de arqueias, principalmente, na proporção de *Methanosaeta* com baixa concentração de Fe [0,5 mg/L], Mo [10 mg/L] e Ni [50 mg/L], com aumento de 8,51%, 10,9% e 4,9% de abundância relativa, respectivamente.

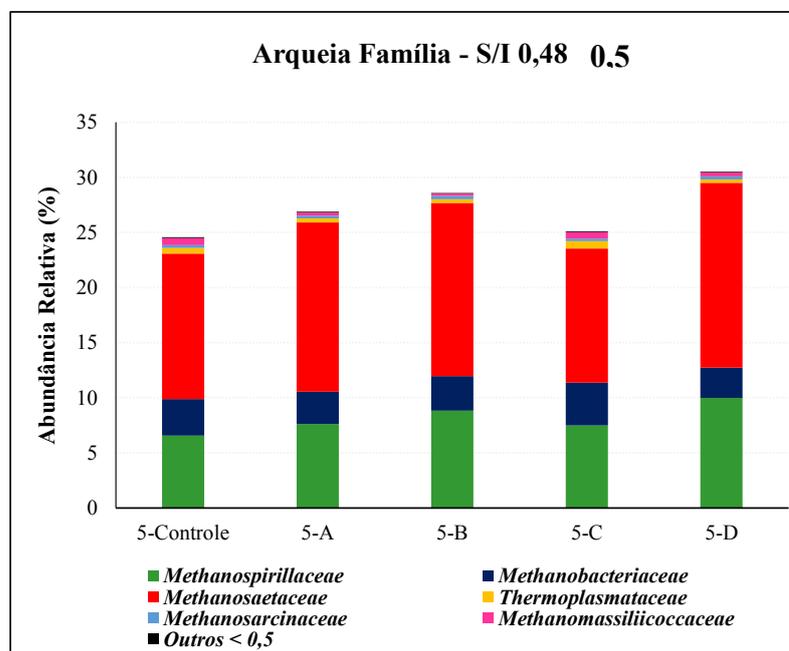
Quando Cai e colaboradores adicionaram Ni [0,05 mg/L] em separado, observou-se 43,8% de abundância relativa de *Methanosaeta* e 12,3% de *Methanobacterium*, diferente deste estudo quando adicionou combinações em que a concentração de níquel era de [0,5 mg/L] a abundância relativa de *Metanosaeta* variou de 11,8 a 21,8% e *Methanobacterium* teve uma média de 2,0 %. Houve mudanças na abundância relativa de *Methanobacterium* com Ni [50 mg/L] teve 3,2% e quando reduziu as concentrações de Ni [0,05 mg/L] teve aumento para 12,3%, indicando que esta metanogênica é mais sensível a este elemento.

Neste estudo, a adição dos elementos traço favoreceu no crescimento e no aumento da abundância das metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, que conseqüentemente, foram as responsáveis pelo consumo dos ácidos orgânicos (acetato) e do H<sub>2</sub>, aumentando na degradação do proionato e do butirato. Os ácidos orgânicos nos ensaios 6-B e 6-C permaneceram semelhantes para acetato, propionato e butirato. Nos ensaios 6-A e 6-D as concentrações de acetato foram semelhantes, entretanto em 6-A não foi detectado butirato, e em 6-D não foi detectado propionato. A baixa concentração de acetato detectada nos ensaios 6 corrobora com a alta proporção de metanogênicas acetoclásticas detectadas via Ion torrente, ou seja, não houve acúmulo de ácidos nos frascos, por isso as concentrações foram baixas (tabela 7-6).

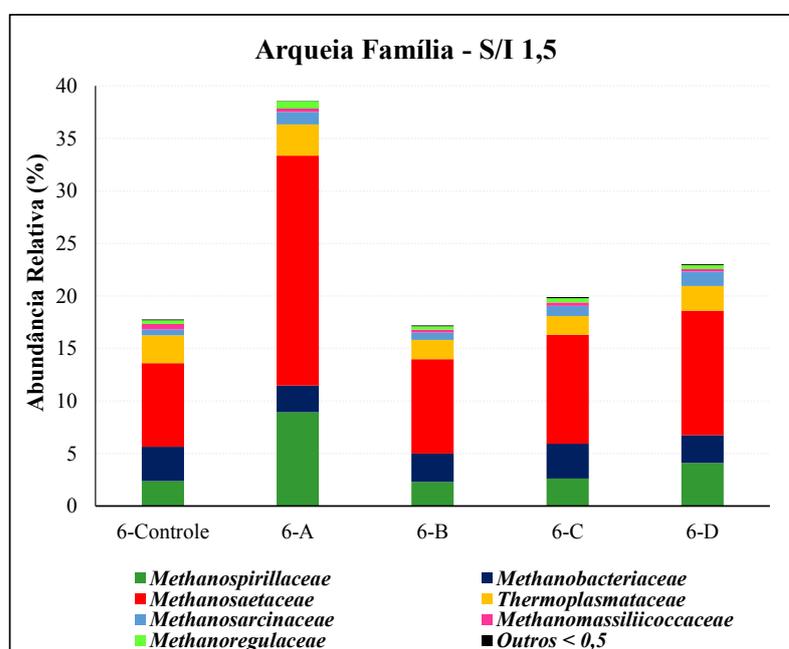
Zhang *et al.* (2015) reportaram que a suplementação de Co [5,0 mg/L], Fe [100 mg/L], Ni [5 mg/L] e Mo [5 mg/L] resultou em uma produção de 504 mLCH<sub>4</sub>/gSV. Enquanto neste estudo, as menores concentrações de Co [1 mg/L], Fe [5 mg/L] e Ni [0,5 mg/L] apresentou a produção de 605,25 NmLCH<sub>4</sub>/g SV de conversão da matéria orgânica. A suplementação de

elementos traço teve efeitos positivos na na produção de metano, quando se utilizou maior razão S/I 1,5 e a adição de elementos traço, também resultou em maior abundância relativa das metanogênicas detectadas.

(E)



(F)



**Figura 7-8.** Composição taxonômica de arqueias metanogênicas em nível de família dos ensaios (e) 5 (S/I 0,5) e (f) 6 (S/I 1,5) conforme resultados do sequenciamento IonTorrent. As letras representam as combinações dos elementos traços. A: Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; B: Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]; C: Co [1,0 mg/L], Fe

[50,0 mg/L] e Ni [5,0 mg/L]; D: Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L]. Os controles continham inóculo e substrato (sem adição de elemento-traço).

Todas as vias da metanogênese da enzima metil-CoM redutase, dependem do níquel com o cofator F<sub>430</sub> (Tabela 7-7) (DEY *et al.*, 2010). Da mesma forma, muitas hidrogenases possuem um centro ferro-níquel acoplado (THAUER *et al.*, 2010). Entretanto, as exigências por elementos traço na metanogênese hidrogenotrófica é bem diferente daquela requerida, quando a via metanogênica acetoclástica é predominante. Rotas acetoclásticas e metilotrófica contêm corrinóide de proteína ferro-enxofre e requer cobalto (SVETLICHANAIA *et al.*, 2006). Neste caso, Co, Fe e Ni são essenciais na formação da enzima CO desidrogenase, Acetil-CoA descarboxilase, metil-HSPT:HS-CoM methyltransferase, methyl-CoM redutase e outras enzimas (KIDA *et al.*, 2001). Acetato quinase requer de magnésio, mas pode ser substituído por cobalto, manganês ou cálcio e o complexo acetil CoA de cobalto e níquel (JABLONSKI *et al.*, 1993; MILES *et al.*, 2001). Os metanogênicos hidrogenotróficos são capazes de substituir as hidrogenases FeNi por hidrogenases de Fe, livres de níquel, únicas para os metanogênicos. Essa diversa demanda pode explicar a dependência da metanogênese por elementos traço.

**Tabela 7-6. Elementos traço e enzimas**

Enzima	Elementos Traço	Processo	Referências
Formiato desidrogenase	Fe, Se, W	Acetogênese	Ljungdahl (1986)
Monóxido Carbono desidrogenase	Fe, Ni, Zn	Acetogênese	Ljungdahl (1986)
Hidrogenase	Fe, Ni	Acetogênese e metanogênese	Shima <i>et al.</i> (2002)
Formil metanofurano desidrogenase	Fe, Mo, W	Metanogênese hidrogenotrófica	Vorholt <i>et al.</i> (1996)
metil-H4MPT:CoM metiltransferase	Co	Metanogênese hidrogenotrófica	Kida <i>et al.</i> (2001)
Tetrahidromethanopterin-S-metiltransferase	Co	Metanogênese hidrogenotrófica	Lienard <i>et al.</i> (1996)
Acetato quinase	Co, Mg, Ca	Metanogênese acetoclástica	Miles <i>et al.</i> (2001)
Acetil-CoA decarboxylase/synthase complex	Co e Ni	Metanogênese acetoclástica	Jablonski <i>et al.</i> (1993)
Metil-CoM redutase	Ni	Metanogênese	Dey <i>et al.</i> (2010)

Composição Microbiana dos Ensaio 5 (razão S/I 0,5) e 6 (S/I 1,5) e sua Relação com a Adição dos Elementos Traço

A análise de sequenciamento revelou que o aumento de carga orgânica (S/I 1,5) teve diferença na influência dos elementos traço sob a comunidade microbiana tratando o resíduo alimentar (tabela 7-8) *Chloroflexi*, *Proteobacteria* e *Euryarchaeota* eram os filos predominantes, principalmente em S/I 1,5.

O filo *Deferribacteres* (família *Deferribacteriaceae*, *Deferribacter* gênero) apareceu em todos os ensaios, principalmente no ensaio 5 com razão S/I de 0,5 com maior abundância. Representantes da família *Deferribacteriaceae* que atuam na solubilização do ferro III durante a fase de crescimento exponencial dos micro-organismos. Estes micro-organismos são capazes de reduzir o Fe (III) e o Mn (IV), bem como o nitrato e o enxofre. São micro-organismos gram-negativos, com formas em bastonetes, com flagelo polar e crescem sob condições anaeróbias pela oxidação de uma variedade de compostos complexos e ácidos orgânicos, na presença de aceptores de elétrons, mas não por fermentação. Além disso, podem utilizar o hidrogênio como aceptor de elétrons, CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e óxido de Fe (III) como aceptor de elétrons (SLOBODKINA *et al.*, 2009).

As bactérias sintróficas foram diversificadas com dominância de *Syntrophaceae* em S/I 0,5 e *Syntrophomonadaceae* (gêneros *Syntrophus* e *Syntrophomonas*) S/I 0,5 e 1,5. *Bellilinea* (gen.) e *Longilinea* (gen.) foram detectadas em todos os ensaios, a exemplo da grande proporção de *Bellilinea* (gen.) (19 a 26%). *Bellilinea* e *Longilinea* são bactérias que foram encontradas juntamente com *Methanosaeta* (tabela 7-8). Essas bactérias atuam em consórcio microbiano juntamente com metanogênicas na degradação de ácidos orgânicos (YAMADA *et al.*, 2007). Essas bactérias filamentosas crescem em ambiente estritamente anaeróbio com pH de 6,0 a 7,5, corroborando com os valores de pH encontrados no final dos ensaios (5 e 6) em torno de 7,5. A adição de elementos traço parece não ter sido influência sob a abundância de *Bellilinea*, uma vez que esteve presente no inóculo e permaneceu durante todos os ensaios S/I 0,5 (5) e 1,5 (6). Ressalta-se que essas bactérias não utilizam Fe (III), sulfato e nitrato como aceptores de elétrons, indicando a importância da atividade de simbiose entre *Bellilinea* e *Methanosaeta* para manutenção do equilíbrio ambiental e, conseqüentemente produção de metano. Essas bactérias sinalizam elevada composição de carboidratos no resíduo alimentar, uma vez que o inóculo era coletado de sistema de tratamento de resíduo alimentar.

Bactérias sintróficas representadas por *Syntrophomonadaceae* estavam presentes em todos os ensaios, atuam juntamente com as metanogênicas hidrogenotróficas (SVETLITSHNYI *et al.*, 1996; WU *et al.*, 2006). Essas bactérias prevaleceram nos ensaios 5 (S/I 0,5) e 6 (S/I 1,5), atuando em simbiose com *Methanospirillaceae* (*Methanospirillum*) e *Methanobacteriaceae* (*Methanobacterium*). Esses micro-organismos possuem hidrogenases e formato desidrogenases (FDHs), das quais as atividades são maiores durante o crescimento sintrófico e na degradação de ácidos orgânicos (propionato, butirato) e síntese de propionato. Entretanto,

a adição de elementos traço não alterou na abundância relativa de *Syntrophomonadaceae* e de *Syntrophaceae*.

*Syntrophomonadaceae* atuam na fermentação de butirato produzindo acetato e H<sub>2</sub>. A degradação do butirato é viável somente com baixa pressão parcial de H<sub>2</sub> (abaixo de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-5</sup> atm) (SCHINK, 1997), quando mantido por simbiose junto com as arqueias metanogênicas. Elevadas concentrações de ácidos orgânicos como propionato, butirato ou acetato são prejudiciais no processo de digestão anaeróbia para formação de metano. Esses ácidos são considerados indicadores de desequilíbrio do processo, enfatizando o crucial papel de sinergia das bactérias sintróficas (AHRING *et al.*, 1995).

A adição dos metais impactou positivamente na produção de metano, com aumento principalmente, para o tratamento com a adição dos metais nas menores concentrações, testes 5-A e 5D e 6-A e 6-D. No ensaio 5 para razão S/I 0,5, a proporção de metanogênicas aumentou nos testes 5-A, 5-B e 5-D, em relação ao controle, indicando principalmente, que *Methanosaetaceae* e *Methanospirillaceae* foram beneficiadas com a adição de Co [1,0 mg/L] e Fe [5 mg/L] em ambas razões S/I (0,5 e 1,5), e *Methanosarcina* aumentou com Co [1,0 mg/L] e Fe [5 mg/L] em S/I 1,5 (tabela 7-8).

Para o ensaio 6 (razão S/I 1,5) a adição dos metais indicou efeito positivo na produção de metano, a variação da composição de arqueias foi evidente nos testes 6-A e 6-D, com aumento na proporção de metanogênicas, quando comparado com o controle. Neste caso aumentou a proporção de *Methanosaetaceae*, *Methanospirillaceae*, *Methanosarcinaceae* e *Methanoregulaceae*.

Comparando os ensaios 6-A e 6-D que diferiram apenas na concentração do cobalto: 1,0 e 10,0 mg/L, respectivamente, pode-se inferir que o Co em maior concentração não foi benéfico para as metanogênicas reduzindo a proporção de *Methanosaetaceae* e *Methanospirillaceae*. Por outro lado, quando se compara os ensaios 6-B com 6-D que diferiram apenas na concentração de Fe, 50 mg/l e 5,0 mg/L, respectivamente, sugere-se que o Fe em maior concentração teve baixa alteração, não tendo efeito negativo sobre a comunidade.

Quando se compara os testes 6-A com 6-C, que diferiram na concentração de Fe e Ni: 5,0 e 0,5 mg/L (teste A) e 50 e 5,0 mg/L (teste C), pode-se inferir que a maior concentração de níquel no teste C teve efeito negativo sobre as metanogênicas *Methanosaetaceae* e *Methanospirillaceae*. Indicando que a comunidade de metanogênicas esteve relacionada com

a concentração de Ni, conforme também verificado no trabalho de Cai *et al.* (2017). Assim, no trabalho de Cai *et al.* (2017), a adição de elementos traço alterou a composição da comunidade de bactérias e de arqueias metanogênicas, mas não alterou a diversidade. Co e Ni foram importantes para o aumento da abundância relativa (%) de metanogênicas. Com relação a comunidade de bactérias, a adição de metais teve efeito significativo na alteração da composição da comunidade na condição da maior relação alimento/micro-organismo, ensaio 6 S/I 1,5, o mesmo não se verificou para a condição com menor razão (S/I 0,5) ensaio 5. Para o ensaio 6, os resultados sugerem que a maior concentração de Fe adicionada favoreceu *Burkholderiales* com aumento na abundância, e a menor concentração de Fe favoreceu *Pseudomonadales*. Os resultados também sugerem que a adição de níquel não teve efeito sobre a comunidade de bactérias.

Comparando os testes 5-A e 5-B, e 6-A e 6-B, pode-se inferir que em condições de baixa relação alimento/micro-organismo (razão S/I 0,5) (tabela 7-7), a adição dos metais não influenciou na comunidade e respectivamente, na produção de metano. Não obstante, para maior relação alimento micro-organismo (razão S/I 1,5), a adição dos metais teve efeito positivo nas menores concentrações testadas, e quando as concentrações de cobalto e ferro foram aumentadas (teste B), verificou-se o efeito sinérgico negativo desses metais sobre a comunidade de metanogênicas (Tabela 7.7). As metanogênicas hidrogenotróficas (amostras 5-C e 5-D), estavam presentes em menor ou igual abundância, comparado com as acetoclásticas, indicando que nesta condição ambas as vias de produção de metano foram importantes, conforme observado na taxa máxima de produção e no rendimento de metano. Já no teste 6 (ensaios 6-A e 6-D), verificou-se que a adição dos elementos traço teve efeito positivo sobre a produção de metano (os maiores valores de rendimento de metano foram para essas amostras, ver tabela 7.8) alterando a composição das metanogênicas e favorecendo a rota acetoclástica da metanogênese.

**Tabela 7-7.** Abundância relativa de bactérias e arqueias nas diferentes concentrações de elementos traço

Táxons	S/I 0,5					S/I 1,5				
	Controle	5-A	5-B	5-C	5-D	Controle	6-A	6-B	6-C	6-D
<i>Chloroflexi</i> (filo)	33,7	32,5	32,0	32,7	29,9	26,9	25,4	23,5	25,3	27,0
<i>Anaerolineaceae</i> (Família)	33,6	32,4	31,9	32,6	29,8	26,8	25,3	23,4	25,3	26,8
<i>Bellilinea</i> (Gênero)	26,7	25,9	24,8	26,3	24,3	20,8	20,7	19,2	20,3	21,7
<i>Longilinea</i> (Gênero)	3,1	3,3	3,1	2,9	2,7	2,9	2,3	2,2	2,3	2,5
<i>Firmicutes</i> (Filo) (fermentadoras)	14,8	16,9	14,8	14,6	15,5	15,7	13,2	12,6	13,9	15,3
<i>Syntrophomonadaceae</i> (Família)	1,4	1,3	1,3	1,4	1,3	2,1	2,0	2,2	2,4	2,7
<i>Syntrophus</i> (Gênero)	1,0	0,6	0,4	0,8	0,8	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
<i>Syntrophomonas</i> (Gênero)	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	1,4	1,4	1,6	1,7	1,8
<i>Proteobacteria</i> (Filo)	6,4	5,2	4,5	5,5	5,1	25,8	9,4	36,4	28,7	22,3
<i>Desulfovibrionaceae</i> (Família)	1,2	1,2	1,0	1,4	1,5	3,7	1,6	1,9	2,9	2,7
<i>Syntrophaceae</i> (Família)	1,5	1,0	0,8	1,3	1,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
<i>Syntrophobacteraceae</i>	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>Burkholderiales</i> (Ordem)	0,7	0,3	0,4	0,5	0,3	14,7	4,3	29,6	21,3	8,9
<i>Comamonadaceae</i> (Família)	0,5	0,1	0,2	0,2	0,2	12,1	<b>2,5</b>	24,4	11,1	4,5
<i>Alcaligenaceae</i> (Família)	0,08	0,08	0,20	0,14	0,06	2,6	<b>1,7</b>	5,2	10,1	4,4
<i>Bacteroidetes</i> (Filo) (hidrolíticas)	11,4	10,6	11,8	13,2	10,2	6,8	7,6	5,1	5,9	7,3
<i>Phorphyromonadaceae</i>	1,2	1,2	1,2	1,3	1,0	1,7	0,8	1,1	1,4	1,1
<i>Synergistetes</i> Filo (degradadora de proteína)	3,7	3,0	2,8	3,0	3,7	1,7	1,2	0,9	1,1	1,0
<i>Spirochaetes</i> (Filo)	0,5	0,9	1,2	1,0	0,7	0,6	1,0	1,2	0,6	0,5
<i>Actinobacteria</i> (Filo)	1,8	1,4	1,9	1,8	1,9	1,1	1,3	1,3	1,3	1,3
<i>Euryarchaeota</i> (Filo)	25,0	27,2	28,8	25,5	30,9	17,9	38,8	17,4	20,2	23,2
<i>Methanosaeta</i> (Gênero) (acetoclástica)	13,2	15,4	15,7	12,2	16,8	8,0	21,9	9,0	10,4	11,9
<i>Methanosarcina</i> (Gênero) (acetoclástica)	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,6	1,2	0,7	1,0	1,4
<i>Methanospirillum</i> (Gênero) (hidrogenotrófica)	6,6	7,6	8,8	7,5	10,0	2,4	9,0	2,3	2,6	4,1
<i>Methanobacterium</i> (Gênero) (hidrogenotrófica)	2,9	2,5	2,7	3,4	2,4	2,4	1,8	2,1	2,5	2,0

Nota: Teste <sup>b</sup>5 (S/I = 0,5) e <sup>b</sup>6 (S/I = 1,5). As concentrações dos elementos traço foram (em mg/L): A:  $\text{CoCl}_2[1]+\text{FeCl}_3[5]+\text{NiCl}_2 [0,5]$ , B:  $\text{CoCl}_2[10]+\text{FeCl}_3[50]+\text{NiCl}_2 [0,5]$ , C:  $\text{CoCl}_2[1]+\text{FeCl}_3[50]+\text{NiCl}_2 [5]$  e D:  $\text{CoCl}_2[10]+\text{FeCl}_3 [5]+\text{NiCl}_2 [0,5]$ . Controle: amostra coletada dos frascos sem adição de elementos traço.

**Tabela 7-8.** Abundância relativa de metanogênicas e a produção de metano

Ensaio	Taxa máxima de produção de metano (NmL/gSV)	Incremento no rendimento de $\text{CH}_4$ NmL/gSV	Abundância relativa de metanogênicas hidrogenotróficas detectadas pelo Ion Torrent (%)	Abundância relativa de metanogênicas acetoclásticas detectadas pelo Ion Torrent (%)
5-controle (S/I 0,5)	30,6	56,5	10,5	13,4
5-A	32,1	58,7	10,8	15,6
5-B	31,9	61,5	12,2	16,0
<b>5-C</b>	<b>40,4</b>	<b>63,7</b>	<b>12,0</b>	<b>12,4</b>
<b>5-D</b>	<b>37,4</b>	<b>61,6</b>	<b>13,0</b>	<b>17,0</b>
6-controle (S/I 1,5)	30,6	50,1	6,5	8,5
<b>6-A</b>	<b>50,2</b>	<b>62,6</b>	<b>12,5</b>	<b>23,0</b>
6-B	32,9	50,6	5,6	9,7
6-C	37,4	49,7	6,7	11,3
<b>6-D</b>	<b>35,4</b>	<b>59,7</b>	<b>7,4</b>	<b>13,2</b>

Nota: Teste 5 (S/I = 0,5) e 6 (S/I = 1,5). As concentrações dos elementos traço foram (mg/L): A:  $\text{CoCl}_2[1]+\text{FeCl}_3[5]+\text{NiCl}_2 [0,5]$ , B:  $\text{CoCl}_2[10]+\text{FeCl}_3[50]+\text{NiCl}_2 [0,5]$ , C:  $\text{CoCl}_2[1]+\text{FeCl}_3[50]+\text{NiCl}_2 [5]$  e D:  $\text{CoCl}_2[10]+\text{FeCl}_3 [5]+\text{NiCl}_2 [0,5]$ . Controle: amostras coletadas dos frascos sem adição de elementos traço.

#### 7.4 Conclusões

A adição dos elementos traços é importante para aumentar a produção de metano, a partir da digestão anaeróbia do resíduo alimentar, uma vez que aumentou a abundância das metanogênicas, tanto acetoclásticas *Methanosaeta*, quanto hidrogenotróficas *Methanospirillaceae*, principalmente quando operado em alta carga orgânica (alta relação alimento/micro-organismos). A adição de cobalto nas concentrações de 1,0 mg/L, ferro 5,0 mg/L e 50 mg/L e níquel 0,5 mg/L e 50 mg/L, foi favorável no desempenho do digestor. Assim como, a adição de molibdênio nas concentrações 0,5 mg/L e 5,0 mg/L, ferro 5,0 mg/L e 50 mg/L e níquel 0,5 mg/L teve efeito combinado e consideravelmente superior, com significativo aumento na produção de metano e estabilidade do processo de digestão anaeróbia, quando comparado com a combinação com cobalto.

Cobalto, ferro e níquel nas maiores concentrações tiveram efeito combinado e negativo sobre a comunidade de metanogênicas. A adição de ferro e cobalto teve efeito positivo sobre a comunidade de bactérias. Portanto, a adição dos elementos traço alterou o desempenho do digestor e do processo de digestão anaeróbia, através da variação na composição e estrutura de bactérias e arqueias. A adição de molibdênio, ferro e níquel teve efeito positivo superior na produção de metano, comparado com a combinação de cobalto, ferro e níquel.

## 8 CONCLUSÕES GERAIS

### Objetivo 1

- Em condição de alta COV, as bactérias fermentadoras/ hidrolíticas (filos *Firmicutes* e *Bacterioidetes*) foram favorecidas, enquanto a abundância de *Proteobacteria* e *Chloroflexi* diminuiu.
- A composição da comunidade metanogênica sofreu alterações em resposta às mudanças na COV. *Methanosaeta* e *Methanospirillum* dominaram em condições de baixa TCO, indicando a importância das metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas para a produção de metano nessa condição. *Methanosaeta* quase desapareceu em condições de elevada TCO, enquanto *Methanoculleus* foi favorecido.
- As interações sintróficas entre bactérias produtoras de hidrogênio (*Syntrophomonas* e *Desulfosporosinus*) e metanogênicas hidrogenotróficas foram evidenciadas com elevada COV.
- O resíduo alimentar, quando armazenado no tanque de alimentação pode resultar na maior liberação de ácidos orgânicos (propiónico e butírico), em função da falta de controle do processo de acidificação, desfavorecendo no desenvolvimento de arqueias metanogênicas, principalmente as acetoclásticas.

### Objetivo 2

- Com relação ao efeito da adição dos elementos traço sobre a produção de metano verificou-se que a adição de ferro (5,0mg/L), e níquel (1,0mg/L) em separado, e a combinação de Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L] e Ni [0,5 mg/L] na situação S/I 1,5, tiveram efeito positivo, resultando no incremento da produção de metano, a partir da degradação do resíduo alimentar. Entretanto a combinação de Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 e 50 mg/L] e Ni [0,5 mg/L], na situação S/I 1,5, tiveram efeito significativamente superior na produção de metano, quando comparado com a combinação de cobalto.
- A adição dos elementos traço (Co, Fe e Ni) em combinação impactou na composição e estrutura da comunidade de bactérias e arqueias, mas não na diversidade.

- Para a menor razão S/I testada (0,5), a adição de elementos traço não afetou a abundância relativa dos grupos de bactérias fermentativas/hidrolíticas (*Firmicutes* e *Bacteroidetes*), não alterou a composição e abundância das bactérias sintróficas e alterou muito pouco a abundância das metanogênicas.

- Para a maior relação S/I testada (1,5), a adição dos elementos traço também não impactou na abundância relativa dos grupos de bactérias fermentadoras e sintróficas, mas aumentou a abundância das metanogênicas (especialmente as acetoclásticas *Methanosaeta*), ressaltando o efeito positivo da adição dos elementos traço (cobalto, ferro e níquel), nas menores concentrações sobre a comunidade das arqueias.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABRELPE, 2013. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais – ABRELPE. Disponível em: <http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2013.pdf>. Acessado em maio de 2015.
- ALIBARDI, L.; COSSU, R. Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Management*, v. 36, p. 147-155, 2015.
- ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *War. Res.* vol. 28, n. 3, p. 727-731, 1994.
- ANGELIDAKI, I.; ELLEGAARD, L.; SORENSEN, A.H.; SCHMIDT, J. E. (2002). Anaerobic processes. In: Angelidaki I, editor. Environmental biotechnology. Institute of Environment and Resources. Technical University of Denmark (DTU). pp. 1-114. <http://www2.er.dtu.dk/publications/fulltext/2010/ENV2010-283.pdf>
- ANGELIDAKI, I.; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; BORZACCONI, L.; CAMPOS, J. L.; GUWY, A. J.; KALYUZHNYI, S.; JENICEK, P.; VAN LIER, J. B. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science e Technology (WST)*, v. 59, n. 5, p. 927-934, 2009.
- ANGENENT, L. T.; SUNG, S.; RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Research*, v. 36, p. 4648–4654, 2002.
- AHRING, B. K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbial. Biotechnol*, v. 43, n. 3, p. 559-565, 1995.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F.; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. *Engenharia Sanitária Ambiental*, vol.12, n. 2, p. 192-201, 2007.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGREVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, n. 6, p. 755-781, 2008.
- BAN, Q.; LI, J.; ZHANG, L.; JHA, A. K.; NIES, L. Linking performance with microbial community characteristics in an anaerobic baffled reactor. *Appl Biochemical Biotechnology*, v.169, p.1822–1836, 2013.
- BANKS, C. J.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; HEAVEN, S. Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 127–135, 2012.
- BEHERA, S. K.; PARK, J. M.; KIM, K. H.; PARK, Hung-Suck. Methane production from food waste leachate in laboratory-scale simulated landfill. *Waste Management*, v. 30, p. 1502–1508, 2010.

- BERNSTAD, A.; JANSEN, J. L. C. A life cycle approach to the management of household food waste - A Swedish full-scale case study. *Waste Management*, v. 31, p. 1879-1896, 2011.
- BERGMANN, E.; NETMANN, K.; MUNDT, K.; KLOCKE, M. Determination of methanogenic Archaea abundance in a mesophilic biogás plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 440-444, 2010.
- BIDDLE, A.; STEWART, L.; BLANCHARD, J.; LESCHINE, S. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in diverse gut communities. *Diversity*, v. 5, p. 627-640, 2013.
- BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; CHEIKH, R. B.; HAMDI, M. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 989-995, 2005.
- CAI, J.; HE, P.; WANG, Y.; SHAO, L.; LU, F. Effects and optimization of the use of biochar in anaerobic digestion of food wastes. *Waste Management & Research*, v. 34, n. 5, p. 409–416, 2016.
- CAI, Y.; HUA, B.; GAO, L.; HU, Y.; YUAN, X.; CUI, Z.; ZHU, W.; WANG, X. Effects of adding trace elements on rice straw anaerobic mono-digestion: Focus on changes in microbial communities using high-throughput Sequencing. *Bioresource Technology*, v.239, p.454–463, 2017.
- CARDINALI-REZENDE, J.; DEBARRY, R.; COLTURATO, L. F. D. B.; CARNEIRO, E. V.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Molecular identification and dynamics of microbial communities in reactor treating organic household waste. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 84, p. 777-789, 2009.
- CARDINALI-REZENDE, J.; ROJAS-OJEDA, P.; NASCIMENTO, A. M. A.; SANZ, J. L. Proteolytic bacterial dominance in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor assessed by 454 pyrosequencing technology. *Chemosphere*, v.146, p.519-525, 2016.
- CHERNICHARO, C. A. L. *Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias: Reatores Anaeróbios*. 2ª Edição. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG: 2007. 380p.
- CHO, S-K; IM, W-T.; KIM, D-H.; KIM, M-H.; SHIN, H-S; OH, S-E. Dry anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: Performance and methanogenic community analysis. *Bioresource Technology*, v. 131, p. 210-217, 2013.
- DANG, Y.; HOLMES, D. E.; ZHAO, Z.; WOODARD, T. L.; ZHANG, Y.; SUN, D.; WANG, L-Y.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with carbon-based conductive materials. *Bioresource Technology*, v. 220, p.516–522, 2016.
- DEMIREL, B.; SCHERER, P. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 992-998, 2011.
- De VOS, P. et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3. The firmicutes. Springer Science and Business Media: New York (NY). 2009.

De VRIEZE, J.; HENNEBEL, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. *Methanosarcina*: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology*, n. 112, p. 1-9, 2012.

De VRIEZE, J.; RAPORT, L.; WILLEMS, B.; VERBRUGGE, S.; VOLCKE, S.; MEERS, E.; ANGENENT, L. T.; BOON, N. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. *Microbiology Biotechnology*, n. 8, p. 776–786, 2015.

FENG, X.-M.; KARLSSON, A.; SVENSSON, B. H. e BERTILSSON, S. Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste e linking process to microflora. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 74, p. 226-240, 2010.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 129, p. 417- 431, 2001.

FIGASTIVA, H.; TREMIER, A.; LE ROUX, S.; BUREAU, C.; DABERT, P. Understanding the anaerobic biodegradability of food waste: Relationship between the typological, biochemical and microbial characteristics. *Journal of Environmental Management*, v. 188, p. 95-107, 2017.

FORSTER-CARNEIRO, T.; PEREZ, M.; ROMERO, L. I.; SALES, D. Dry-thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: Focusing on the inoculum sources. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3195-3203, 2007.

GALLERT, C.; WINTER, J. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 48, p. 405-410, 1997.

GARDNER, GARY. 2012. Municipal Solid Waste Growing. Worldwatch Vital Signs. Disponível em: <http://vitalsigns.worldwatch.org/vs-trend/municipal-solid-waste-growing>. Acesso em: julho, 2014.

GOBERNA, M.; GADERMAIER, M.; GARCÍA, C.; WETT, B. e INSAM, H. Adaptation of Methanogenic Communities to the Cofermentation of Cattle Excreta and Olive Mill Wastes at 37°C and 55°C. *Appl. Environ. Microbiology*, v. 76, n. 19, p. 6564-6571, 2010.

GUO, X.; WANG, C.; SUN, F.; ZHU, W.; WU, W. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. *Bioresource Technology*, v. 152, p. 420-428, 2014.

GUSTAVSSON, J.; SVENSSON, B.; KARLSSON, A. The feasibility of trace element supplementation for stable operation of wheat stillage fed biogas tank reactors. *Water Sci. Technology*, v. 64, p. 320–325, 2011.

HANSEN, K. H.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Resource*, v. 32, n. 1, p. 5-12, 1998.

HATTORI, S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments, *Microbes Environmental*, v. 23, p. 118-127, 2008.

- HUG, L. A.; CASTELLE, C. J.; WRIGHTON, K., C. et al. Genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome*, n.1, p.1-17, 2013.
- IPCC. Working group II to the Fourth Assessment Report. In: Adger, W.N., Kajfez-Bogataj, L. et al (Ed.) *Climate Change 2007 and Impacts, Adaptation and Vulnerability*. 1 ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007. p. 717-743.
- JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 12, p. 3619-3625, 2008.
- JIANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Strategies for stable anaerobic digestion of vegetable waste. *Renewable Energy*, v. 44, p. 206-214, 2012.
- JONES, J. B.; STADTMAN, T. C. Methanococcus vanniellii: culture and effects of selenium and tungsten on growth. *Journal Bacteriology*, v. 130, p. 1404-1406, 1977.
- KARLSSON, A.; EINARSSON, P.; SCHNURER, A.; SUNDBERG, C.; EJLERTSSON, J.; SVENSSON, B. H. Impact of trace element addition on degradation efficiency of volatile fatty acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 114, n. 4, p.446-452, 2012.
- KATO, S.; WATANABE, K. Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia. *Microbes Environmental*, v.25, p.145–151, 2010.
- KIDA, K.; MORIMURA, S.; SONODA, Y., (1993). Accumulation of propionic acid during anaerobic treatment of distillery wastewater from barley-shochu making. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 75, p. 213–216, 1993.
- KIM, J. K.; HAN, G. H.; OH, B. R.; CHUN, Y. N.; EOM, C-Y.; KIM, S. W. Volumetric scale-up of a three stage fermentation system for food waste treatment. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4394–4399, 2008.
- KOMEMOTO, K.; LIMA, Y. G. NAGÃO, N.; ONOUE, Y.; NIWA, C.; TODA, T. Effect of temperature on VFA's and biogas production in anaerobic solubilization of food waste. *Waste Management*, v. 29, p. 2950-2955, 2009.
- LEE, J.; HWANG, B.; KOO, T.; SHIN, S. G.; K. W.; H. S. Temporal variation in methanogen communities of four different full-scale anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater. *Bioresource Technology*, v.168, p.59-63, 2014.
- LEVÉN, L.; ERIKSSON, A. R. B.; SHNÜRER, A. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic house hold waste. Federation of European Microbiological Societies – FEMS. *Microbiol Ecol.*, v. 59, p. 683–693, 2007.
- LI, Y., PARK, S. Y.; ZHU, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 821-826, 2011.
- LIENARD, T.; BECHER, B.; MARSCHALL, M.; BOWIEN, S.; GOTTSCHALK, G. Sodium ion translocation by N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gol reconstituted in ether lipid liposomes. *Eur. J. Biochemical*, v. 239, p. 857-864, 1996.
- LINDORFER, H.; RAMHOLD, D.; FRAUZ, B. Nutrient and trace element supply in anaerobic digestion plants and effect of trace element application. *Water Science & Technology*, v. 66, n.9, p. 1923-1929, 2012.

- LISBOA, M. S.; LANSING, S. Characterizing food waste substrates for co-digestion through biochemical methane potential (BMP) experiments. *Waste Management*, v. 33, p. 2664-2669, 2013.
- LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals Nova York Academy of Sciences*, v. 1125, p.171-189, 2008.
- LIU, R. R.; TIAN, Q.; YANG, B.; CHEN, J. H. Hybrid anaerobic baffled reactor for treatment of desizing wastewater. *Int. Journal Environ. Sci. Techonology*, 7 (1), 111-118, 2010.
- LJUNGDAHI, L. G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann. Ver. Microbiology*, p. 415-450, 1986.
- LOZANO, C. J.; MENDOZA, M. V.; ARANGO, M. C; MONROY, E. F. Microbiological Characterization and Specific Methanogenic Activity of Anaerobe Sludges Used in Urban Solid Waste Treatment. *Waste Management*, v. 29, n. 2, p. 704-711, 2009.
- LUO, G.; WANG, W.; ANGELIDAKI, I. Anaerobic Digestion for Simultaneous Sewage Sludge Treatment and CO Biomethanation: Process Performance and Microbial Ecology. *Environmental Science Technology*, v. 47, p. 10685-10693, 2013.
- MA, J.; WANG, Z.; YANG, Y.; MEI, X.; WU, Z. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing. *Water Resource*, v.47, p.859-869, 2013.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12<sup>a</sup> Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, L.; FONT, X.; VICENT, T. Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. *Biochem Eng J*. v.76, p.1-5, 2013.
- MARTINS, A. S.; FERREIRA, O. B.; RIBEIRO, N. C.; MARTINS, R.; LEITE, L. R.; OLIVEIRA, G.; COLTURATO, L. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. Metagenomic analysis and performance of a mesophilic anaerobic reactor treating food waste at various load rates. *Environmental Technology*, 2016.
- MATA-ALVAREZ, J.; MACÉ, S. LLABRÉS, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 3-16, 2000.
- MOESTEDT, J.; NORDELL, E.; YEKTA, S. S.; LUNDGREN, J.; MARTI, M.; SUNDBERG, C.; EJLERTSSON, J.; SVENSSON, B. H.; BJORN, A. Effects of trace element addition on process stability during anaerobic co-digestion of OFMSW and slaughterhouse waste. *Waste Management*, 2015.
- MUYZER, G.; STAMS, A. J. The Ecology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Nature Reviews: Microbiology*, v. 6, p. 441-454, 2008.
- NAGAO, N.; TAJIMA, N.; KAWAI, M.; NIWA, C.; KUROSAWA, N.; MATSUSHI, T.; YUSOFF, F. M; TODA, T. Maximum organic loading rate for the single-stage wet anaerobic digestion of food waste. *Bioresource Technology*, v. 118, 210-218, 2012.
- NELSON, M. C.; MORRISON, M.; YU, Z. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, v. 102, p.3730-3739, 2011.

- PALATSI, J.; ILLA, J.; PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; LAURENI, M.; FERNANDEZ, B.; ANGELIDAKI, I.; FLOTATS, X. Long-chain Fatty Acids Inhibition and Adaptation Process in Anaerobic Thermophilic Digestion: Batch Tests, Microbial Community Structure and Mathematical Modelling. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 2243-2251, 2010.
- PAULO, L. M.; STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z. Methanogens, sulphate and heavy metals: a complex system. *Rev. Environmental Sci. Biotechnology*, v. 14, p. 537-553, 2015.
- PATIDAR, S.; TARE, V. Effect of micronutrients in anaerobic degradation of sulfate-laden organics. *Canadian Journal of Civil Engineering*, v.31, n.3, p. 420-431, 2004.
- PATIDAR, S. K.; TARE, V. Effect of nutrients on biomass activity in degradation of sulfate laden organics. *Process Biochem.* v. 41, p. 489–495, 2006.
- POBEHEIM, H.; MUNK, B.; JOHANSSON, J.; GUEBITZ, G. M. Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 836-839, 2010.
- POBEHEIM, H.; MUNK, B.; LINDORFER, H.; GUEBITZ, G. M. Impact of nickel and cobalt on biogas production and process stability during semi-continuous anaerobic fermentation of a model substrate for maize silage. *Water Resource*, v. 45, p. 781–787, 2011.
- QIANG, H.; LANG, D-L.; LI, Y-Y. High-solid mesophilic methane fermentation of food waste with emphasis on Iron, cobalt and nickel requirements. *Bioresource Technology*, v.103, p.21-27, 2012.
- QIAOYING, B.; JIANZHENG, L.; LIGUO, Z.; AJAY KUMAR, J.; LORING, N. Linking Performance with Microbial Community Characteristics in an Anaerobic Baffled Reactor. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 169, p. 1822–1836, 2013.
- RAPOSO, F.; FERNANDEZ-CEGRÍ, V.; DE LA RUBIA, M. A.; BORJA, R.; BELINE, F.; CAVINATO, C.; DEMIRER, G.; FERNANDEZ, B.; FERNANDEZ-POLANCO, M.; FRIGON, J. C.; GANESH, R.; KAPARAJU, P.; KOUBOVA, J.; MENDEZ, R. M.; MENIN, G.; PEENE, A.; SCHERER, P.; TORRIJOS, M.; UELLEND AHL, H.; WIERINCK, I.; DE WILDE, V. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 86, p. 1088-1098, 2011.
- RASKIN, L.; ZHENG, D.; GRIFFIN, M. E.; STROOT, P. G.; MISRA, P. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 68, p. 297-308, 1995.
- REGUEIRO, L.; VEIGA, P.; FIGUEROA, M.; ALONSO-GUTIERREZ, J.; STAMS, A. J. M.; LEMA, J. M.; CARBALLA, M. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiology Resource*, v.167, p.581–589, 2012.
- RIVIÈRE D.; DESVIGNES V.; PELLETIER E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SQHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME Journal*, v. 3, p. 700-714, 2009.
- SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; WEILAND, P.; TRAVIESO, L.; MARTÍN, A. Effect of temperature and pH on the kinetics of methane production, organic nitrogen and phosphorus removal in the batch anaerobic digestion process of cattle manure. *Bioprocess Engineering*, v. 22, p. 247-252, 2000.

- SCHMIDT, T.; NELLES, M.; SCHOLWIN, F.; PROTER, J. Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage – Optimization of metal dosing. *Bioresource Technology*, v. 168, p. 80-85, 2014.
- THAUER, R. K.; KASTER, A. K.; GOENRICH, M.; SCHICK, M.; HIROMOTO, T.; SHIMA, S. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H<sub>2</sub> storage. *Annu. Rev. Biochemical*, v. 79, p. 507–536, 2010.
- SHIMA, S.; WARKENTIN, E.; THAUER, R. K.; ERMLER, U. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *Journal Bioscience Bioeng.*, v. 93, p. 519-530, 2002.
- SOLLI, L.; HAVELSRUD, O. E.; HORN, S. J.; RIKE, A. G. A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnol Biofuels*, v.7, p.146, 2014.
- SOUSA, D. Z.; SMIDT, H.; ALVES, M. M.; STAMS, A. J. M. Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *Federation of European Microbiological Societies Journals*, v.68, p.257-272, 2009.
- STRÄUBER, H.; SCHRÖDER, M.; KLEINSTEUBER, S. Metabolic and microbial community dynamics during the hydrolytic and acidogenic fermentation in a leach-bed process. *Energy, Sustainability and Society*, n. 2, v. 113, p. 1-10, 2012.
- SUNDBERG, C.; AL-SOUD, W. A.; LARSSON, M. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecology*, v.85, p.612-626, 2013.
- TAKASHIMA, M.; SPEECE, R. E. Mineral nutrient requirements for high-rate methane fermentation acetate at low SRT. *Water Environment Federation*, v. 61, n. 11/12, p. 1645-1650, 1989.
- TEIXEIRA, A. R.; CHERNICHARO, C. A. L.; AQUINO, S. F. Influência da redução do tamanho de partículas na taxa de hidrólise de esgoto bruto doméstico. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.13, n.4, p.405-415, 2008.
- VANDEVIVERE, P.; DE BAERE, L.; VERSTRAETE, W. Types of Anaerobic Digester for Solid Wastes. *Biomethanization of the Organic Fraction Municipal Wastes*, IWA Press, London, p.111-137, 2002.
- VAZOLLER, R. F.; MANFIO, G. P.; CANHOS, V. P. Domínio Archaea: Reinos Crenarcheota, Euryarcheota e Korarcheota. In: CANHOS, V. P., VAZOLLER, R. F. (Ed.) *Série biodiversidade do estado de São Paulo: microrganismos e vírus*. São Paulo, v. I, 1999.
- VINTILOIU, A.; BOXRIKER, M.; LEMMER, A.; OECHSNER, H.; JUNGBLUTH, T.; MATHIES, E.; RAMHOLD, D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the bioavailability of trace elements during anaerobic digestion. *Chemical Eng. Journal*, v. 223, p.436-441, 2013.
- XU, JIANPING. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, v. 15, n. 7, p. 1713-1731, 2006.
- ZÁBRANSKÁ, J.; STÉPOVÁ, J.; WACHTI, R.; JENICEK, P.; DOHÁNYOS, M. The activity of anaerobic biomass in thermophilic and mesophilic digesters different loading rates. *Water Science & Technology*, v. 42, n. 9, p. 49-56, 2000.

- ZAMANZADEH, M.; HAGEN, L.; SVENSSON, K.; LINJORDET, R.; HORN, S. J. Anaerobic digestion of food waste e effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Research*, v. 96, p. 246-254, 2016.
- ZHANG, R.; EL-MASHAD, H.M.; HARTMAN, K.; WANG, F.; LIU, G.; CHOATE, C.; GAMBLE, P. Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 929–935, 2007.
- ZHANG, Y.; BANKS, C.; JIANG, Y.; HEAVEN, S.; BOLZONELLA, D. Final recommendations for trace element and nutrient supplementation for stable operation of digesters receiving food waste. Seventh Framework Programme Theme Energy.2009.3.2.2. Biowaste as feedstock for 2nd generation, 2010.
- ZHANG, L.; LEE, Y-W; JAHNG, D. Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: Focusing on the role of trace elements. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 5048-5059, 2011.
- ZHANG L.; JAHNG D. Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Management* n° 32, 1509–1515. 2012
- ZHANG, C; SU, H.; TAN, T. Batch and semi-continuous anaerobic digestion of food waste in a dual solid–liquid system. *Bioresource Technology*, v. 145, p.10–6, 2013.
- ZHANG, W.; ZHANG, L.; LI, A. Enhanced anaerobic digestion of food waste by trace metal elements supplementation and reduced metals dosage by green chelating agente (S, S)-EDDS via improving metals bioavailability. *Water Research*, v. 84, p. 266-277, 2015.
- ZHANG, W.; LANG, Q.; FANG, M.; LI, X.; BAH, H.; DONG, H.; DONG, R. Combined effect of crude fat content and initial substrate concentration on batch anaerobic digestion characteristics of food waste. *Bioresource Technology*, v. 232, p.304–312, 2017.
- ZHOU, P.; ELBESHBIHY, E.; NAKHLA, G. Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. *Bioresource Technology*, v.130, p.710-718, 2013.
- WAN, S.; SUN, L.; DOUIB, Y.; SUN, J.; LUO, W. Anaerobic digestion of municipal solid waste composed of food waste, wastepaper, and plastic in a single-stage system: Performance and microbial community structure characterization. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 619-627, 2013.
- WANG, X.; HU, M.; XIA, Y.; WEN, X.; DING, K. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Applied Environmental Microbiology*, v. 78, n. 19, p. 7042-7047, 2012.
- YU, Y.; LEE, C.; KIM, J.; HWANG, S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 89, p. 670-678, 2005.
- YU, D.; KUROLA, J. M.; LÄHDE, K.; KYMÄLÄINEN, M.; SINKKONEN, A.; ROMANTSCHUCK, M. Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processe. *Journal of Environmental Management*, v. 143, p.54-60, 2014.
- WOON, K. S.; LO, I. M. C.; CHIU, S. L. H.; YAN, D. Y. S. Environmental assessment of food waste valorization in producing biogas for various types of energy use based on LCA approach. *Waste Management*, v.50, p.290–299, 2016.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. *Anaerolinea thermolimosa* sp, nov. *Levilinea saccharolytica* gen, nov., sp, nov, and *Leptolinea tardivitalis* gen, nov., sp., nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov, and *Caldilineae* classis nov, in the bacterial phylum *Chloroflexi*. *Journal System Evolution Microbiology*, v. 56, p. 1331-1340, 2006.

YI, J.; DONG, B.; JIN, J.; DAI, X. Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. *PLoS ONE*, v.9, n.7, p.102-548, 2014.

YOON, Y-M.; SHIN, K-S.; KIM, S-H.; KIM, C-H. Effects of substrate to inoculum ratio on the biochemical methane potential of piggery slaughterhouse wastes. *Asian Australas Journal Animal Sciences*, v. 27, n. 4, p.600-606, 2014.

## 10 APÊNDICE

### 10.1 Resultados Complementares de Montagem dos Testes - Objetivo específico 2

**Tabela 10-1.** Teste 1. Diferentes tipos de inóculos, massas e volumes utilizados

Ensaio	Amostra	Relação S/I	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Água (mL)	Volume Total (mL)
A	Branco I	0,5	-	-	304	17,30	96	400
A	Branco II	0,5	-	-	304	17,30	96	400
A	Inóculo Biodigestor I	0,5	95	8,75	304	17,30	1	400
A	Inóculo Biodigestor II	0,5	95	8,75	304	17,30	1	400
A	Inóculo Biodigestor III	0,5	95	8,75	304	17,30	1	400
B	Branco I	0,5	-	-	286	20,60	114	400
B	Branco I	0,5	-	-	286	20,60	114	400
B	Inóculo UASB-pMethar I	0,5	110	10,10	286	20,60	4	400
B	Inóculo UASB-pMethar II	0,5	110	10,10	286	20,60	4	400
B	Inóculo UASB-pMethar III	0,5	110	10,10	286	20,60	4	400
C	Branco I	0,5	-	-	300	19,03	100	400
C	Branco I	0,5	-	-	300	19,03	100	400
C	Inóculo UASB - Cepts I	0,5	100	9,19	300	19,03	-	400
C	Inóculo UASB - Cepts II	0,5	100	9,19	300	19,03	-	400
C	Inóculo UASB - Cepts III	0,5	100	9,19	300	19,03	-	400

**Tabela 10-2.** Teste 1. Diferentes tipos de inóculos, parâmetros medidos no início e no final da montagem

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura (Inicial)</b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura (Final)</b>
A	Branco I	7,27	26,1°C	8,68	35°C
A	Branco II	7,41	25,9°C	8,20	35°C
A	Inóculo Biodigestor I	6,78	25,5°C	8,05	35°C
A	Inóculo Biodigestor II	6,88	25,6°C	8,21	35°C
A	Inóculo Biodigestor III	6,71	25,5°C	8,24	35°C
B	Branco I	7,53	25,9°C	8,22	35°C
B	Branco I	7,48	25,9°C	8,28	35°C
B	Inóculo UASB-PM I	6,88	25,5°C	8,10	35°C
B	Inóculo UASB-PM II	6,86	25,4°C	8,15	35°C
B	Inóculo UASB-PM III	6,83	25,4°C	7,77	35°C
C	Branco I	6,84	26,0°C	7,45	35°C
C	Branco I	6,83	26,0°C	7,40	35°C
C	Inóculo UASB - Cepts I	5,74	25,4°C	5,64	35°C
C	Inóculo UASB - Cepts II	5,69	25,4°C	5,49	35°C
C	Inóculo UASB - Cepts III	5,66	25,2°C	5,37	35°C

2) Testes com diferentes relações substrato/inóculo (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0) para definição da melhor relação ou condição a ser adotada,

**Tabela 10-3.** Teste 2. Diferentes relações substrato/inóculo, massas e volumes utilizados na montagem

Ensaio	Amostra	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Água (mL)	Volume Total (mL)
A	Branco I	-	-	80	8,3	320	400
A	Branco I	-	-	80	8,3	320	400
A	Branco I	-	-	80	8,3	320	400
A	S/I 0,5	80	4,2	80	8,3	240	400
A	S/I 0,5	80	4,2	80	8,3	240	400
A	S/I 0,5	80	4,2	80	8,3	240	400
B	S/I 1,0	82	8,6	80	8,3	238	400
B	S/I 1,0	82	8,6	80	8,3	238	400
B	S/I 1,0	82	8,6	80	8,3	238	400
B	S/I 1,5	80	12,5	80	8,3	240	400
C	S/I 1,5	80	12,5	80	8,3	240	400
C	S/I 1,5	80	12,5	80	8,3	240	400
C	S/I 2,0	80	16,7	80	8,3	240	400
C	S/I 2,0	80	16,7	80	8,3	240	400
C	S/I 2,0	80	16,7	80	8,3	240	400

**Tabela 10-4.** Teste 3. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes relações substrato/inóculo (S/I) de 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>Substrato (mL)</b>	<b>Massa Alimento (gSV)</b>	<b>Inóculo (mL)</b>	<b>Massa Inóculo (gSV)</b>	<b>Água (mL)</b>	<b>Volume Total (mL)</b>
Branco	Branco I	-	-	80	8,3	320	400
Branco	Branco II	-	-	80	8,3	320	400
Branco	Branco III	-	-	80	8,3	320	400
A	S/I 1,5	80	12,5	80	8,3	240	400
A	S/I 1,5	80	12,5	80	8,3	240	400
A	S/I 1,5	80	12,6	80	8,3	240	400
B	S/I 2,0	79	17,0	80	8,3	241	400
B	S/I 2,0	79	17,0	80	8,3	241	400
B	S/I 2,0	79	17,0	80	8,3	241	400
C	S/I 2,5	80	20,8	80	8,3	240	400
C	S/I 2,5	80	20,8	80	8,3	240	400
C	S/I 2,5	80	20,8	80	8,3	240	400
D	S/I 3,0	80	25,2	80	8,3	240	400
D	S/I 3,0	80	25,2	80	8,3	10	400
D	S/I 3,0	80	25,2	80	8,3	10	400

**Tabela 10-5.** Teste 3. Parâmetros medidos no início e no final da montagem do teste com diferentes relações substrato/inóculo (S/I)

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Potencial Redox (mV)</b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura (Final)</b>
Branco	Branco I	7,23	-33	7,17	28,9°C
Branco	Branco I	7,20	-31	7,25	28,6°C
Branco	Branco I	7,22	-31	7,20	29,0°C
A	S/I 1,5	7,23	-31	7,27	28,9°C
A	S/I 1,5	7,23	-31	7,79	28,9°C
A	S/I 1,5	7,29	-35	7,84	28,9°C
B	S/I 2,0	7,25	-33	7,81	30,1°C
B	S/I 2,0	7,25	-33	7,93	29,9°C
B	S/I 2,0	7,26	-33	7,96	30,0°C
C	S/I 2,5	7,28	-34	7,91	30,0°C
C	S/I 2,5	7,24	-32	7,82	29,9°C
C	S/I 2,5	7,20	-30	7,79	29,4°C
D	S/I 3,0	7,31	-36	7,63	28,8°C
D	S/I 3,0	7,28	-34	7,51	28,6°C
D	S/I 3,0	7,27	-36	7,62	26,8°C

2) Testes com adição de elementos traço (cloreto de níquel, cloreto férrico, cloreto de cobalto e molibdênio). Todos os elementos foram testados separadamente em diferentes concentrações (cada concentração em triplicata).

**Tabela 10-6.** Teste 4. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de cloreto férrico em diferentes concentrações

Ensaio	Amostra	Relação S/I	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Cloreto Férrico (mL)	Água (mL)	Volume Total (mL)
Branco	Branco	0,5	-	4,7	165	9,5	-	235	400
Controle	Controle I	0,5	50	4,7	165	9,5	-	185	400
Controle	Controle II	0,5	50	4,7	165	9,5	-	185	400
A	Fe [5,0 mg/L] – I	0,5	50	4,7	165	9,5	*200	184,8	400
A	Fe [5,0 mg/L] – II	0,5	50	4,7	165	9,5	*200	184,8	400
A	Fe [5,0 mg/L] – III	0,5	50	4,7	165	9,5	*200	184,8	400
B	Fe [25 mg/L] – I	0,5	50	4,7	165	9,5	1,0	184	400
B	Fe [25 mg/L] – II	0,5	50	4,7	165	9,5	1,0	184	400
B	Fe [25 mg/L] – III	0,5	50	4,7	165	9,5	1,0	184	400
C	Fe [250 mg/L] – I	0,5	50	4,7	165	9,5	10,0	175	400
C	Fe [250 mg/L] – II	0,5	50	4,7	165	9,5	10,0	175	400
C	Fe [250 mg/L] – III	0,5	50	4,7	165	9,5	10,0	175	400
D	Fe [2500 mg/L] – I	0,5	50	4,7	165	9,5	100,0	85	400
D	Fe [2500 mg/L] – II	0,5	50	4,7	165	9,5	100,0	85	400
D	Fe [2500 mg/L] - III	0,5	50	4,7	165	9,5	100,0	85	400

\* µL

**Tabela 10-7.** Teste 4. Parâmetros medidos no início e no final da montagem do teste com diferentes concentrações de cloreto férrico

<b>Ensaio</b>	<b>Amostras</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura(inicial)</b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura(final)</b>
Br	Branco	7,40	23,1°C	7,72	26,1°C
Controle I	Controle I	7,09	23,2°C	7,41	26,1°C
Controle II	Controle II	7,10	23,1°C	7,46	27,6°C
A	Fe [5,0 mg/L] – I	7,13	23,1°C	7,62	27,6°C
A	Fe [5,0 mg/L] – II	7,23	23,1°C	7,58	26,6°C
A	Fe [5,0 mg/L] – III	7,25	23,0°C	7,61	26,1°C
B	Fe [25 mg/L] – I	7,22	23,1°C	7,50	26,8°C
B	Fe [25 mg/L] – II	7,24	23,1°C	7,45	27,0°C
B	Fe [25 mg/L] – III	7,16	23,2°C	7,48	26,5°C
C	Fe [250 mg/L] – I	7,32	23,1°C	7,54	26,5°C
C	Fe [250 mg/L] – II	7,32	23,0°C	7,50	26,0°C
C	Fe [250 mg/L] – III	7,35	23,0°C	7,61	26,1°C
D	Fe [2500 mg/L] – I	7,36	22,9°C	7,65	25,2°C
D	Fe [2500 mg/L] – II	7,39	23,0°C	7,59	25,3°C
D	Fe [2500 mg/L] - III	7,37	23,0°C	7,67	25,2°C

**Tabela 10-8.** Teste 5. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de cloreto de níquel

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>Relação S/I</b>	<b>Substrato (mL)</b>	<b>Massa Substrato (gSV)</b>	<b>Inóculo (mL)</b>	<b>Massa Inóculo (gSV)</b>	<b>Água (mL)</b>	<b>Níquel (mL)</b>	<b>Volume Total (mL)</b>
Branco	Branco	0,5	-	-	190	10,92	210	-	400
Controle	Controle I	0,5	60	5,37	190	10,92	150	-	400
Controle	Controle II	0,5	60	5,37	190	10,92	150	-	400
A	Ni [0,25 mg/L] – I	0,5	60	5,37	190	10,92	148	2	400
A	Ni [0,25 mg/L] – II	0,5	60	5,37	190	10,92	148	2	400
A	Ni [0,25 mg/L] – III	0,5	60	5,37	190	10,92	148	2	400
B	Ni [0,5 mg/L] – I	0,5	60	5,37	190	10,92	146	4	400
B	Ni [0,5 mg/L] – II	0,5	60	5,37	190	10,92	146	4	400
B	Ni [0,5 mg/L] – III	0,5	60	5,37	190	10,92	146	4	400
C	Ni [1,0 mg/L] – I	0,5	60	5,37	190	10,92	142	8	400
C	Ni [1,0 mg/L] – II	0,5	60	5,37	190	10,92	142	8	400
C	Ni [1,0 mg/L] – III	0,5	60	5,37	190	10,92	142	8	400
D	Ni [5,0 mg/L] - I	0,5	60	5,37	190	10,92	110	40	400
D	Ni [5,0 mg/L] - II	0,5	60	5,37	190	10,92	110	40	400
D	Ni [5,0 mg/L] - III	0,5	60	5,37	190	10,92	110	40	400

**Tabela 10-9.** Teste 5. Parâmetros medidos no início e no final da montagem do teste com diferentes concentrações de cloreto de níquel

<b>Ensaio</b>	<b>Amostras</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura(inicial)</b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura(final)</b>
Br	Branco	7,57	22,3°C	7,63	28,3°C
Controle I	Controle I	6,94	19,2°C	7,69	27,8°C
Controle II	Controle II	6,92	19,5°C	7,65	28,1°C
A	NiCl <sub>2</sub> [0,25 mg/L] – I	6,90	19,2°C	7,67	27,9°C
A	NiCl <sub>2</sub> [0,25 mg/L] – II	6,92	19,0°C	7,63	27,9°C
A	NiCl <sub>2</sub> [0,25 mg/L] – III	6,91	19,2°C	7,64	27,9°C
B	NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L] – I	6,91	19,1°C	7,62	28,1°C
B	NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L] – II	6,88	18,6°C	7,66	28,0°C
B	NiCl <sub>2</sub> [0,5 mg/L] – III	6,95	18,4°C	7,61	27,9°C
C	NiCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L] – I	6,92	18,6°C	7,59	27,9°C
C	NiCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L] – II	6,91	18,3°C	7,67	27,8°C
C	NiCl <sub>2</sub> [1,0 mg/L] – III	6,95	18,3°C	7,64	27,7°C
D	NiCl <sub>2</sub> 5,0 mg/L] – I	6,85	17,4°C	7,70	27,7°C
D	NiCl <sub>2</sub> 5,0 mg/L] – II	6,95	17,4°C	7,66	27,4°C
D	NiCl <sub>2</sub> 5,0 mg/L] - III	6,95	19,0°C	7,62	27,6°C

**Tabela 10-11.** Teste 6. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de cloreto de cobalto

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>Relação S/I</b>	<b>Substrato (mL)</b>	<b>Massa Substrato (gSV)</b>	<b>Inóculo (mL)</b>	<b>Massa Inóculo (gSV)</b>	<b>Água (mL)</b>	<b>Cobalto (mL)</b>	<b>Volume Total (mL)</b>
Branco	Branco	0,5	-	7,24	250	14,25	235	-	400
Controle	Controle I	0,5	80	7,24	250	14,25	185	-	400
Controle	Controle II	0,5	80	7,24	250	14,25	185	-	400
A	Co [1,0 mg/L] – I	0,5	80	7,24	250	14,25	184,8	4	400
A	Co [1,0 mg/L] – II	0,5	80	7,24	250	14,25	184,8	4	400
A	Co [1,0 mg/L] – III	0,5	80	7,24	250	14,25	184,8	4	400
B	Co [5,0 mg/L] – I	0,5	80	7,24	250	14,25	184	20	400
B	Co [5,0 mg/L] – II	0,5	80	7,24	250	14,25	184	20	400
B	Co [5,0 mg/L] – III	0,5	80	7,24	250	14,25	184	20	400
C	Co [10,0 mg/L] – I	0,5	80	7,24	250	14,25	175	40	400
C	Co [10,0 mg/L] – II	0,5	80	7,24	250	14,25	175	40	400
C	Co [10,0 mg/L] – III	0,5	80	7,24	250	14,25	175	40	400

**Tabela 10-12.** Teste 6. Parâmetros medidos no início e no final da montagem dos testes com diferentes concentrações de cloreto de cobalto

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura<sub>(inicial)</sub></b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura<sub>(final)</sub></b>
Br	Branco	7,55	23,7°C	7,67	23,8°C
Controle I	Controle I	7,20	23,0°C	7,67	23,7°C
Controle II	Controle II	7,18	23,2°C	7,66	23,6°C
A	Co [1,0 mg/L] – I	7,20	22,6°C	7,78	23,8°C
A	Co [1,0 mg/L] – II	7,22	23,0°C	7,70	23,9°C
A	Co [1,0 mg/L] – III	7,25	23,0°C	7,77	23,9°C
B	Co [5,0 mg/L] – I	7,23	22,9°C	7,70	24,0°C
B	Co [5,0 mg/L] – II	7,21	22,7°C	7,72	24,0°C
B	Co [5,0 mg/L] – III	7,30	23,2°C	7,75	24,1°C
C	Co [10,0 mg/L] – I	7,18	23,4°C	7,79	24,1°C
C	Co [10,0 mg/L] – II	7,24	22,9°C	7,74	24,1°C
C	Co [10,0 mg/L] – III	7,23	22,9°C	7,73	24,1°C

**Tabela 10-13.** Teste 7. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de molibdato de amônio

Ensaio	Amostra	Relação S/I	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Água (mL)	Molibdênio (mL)	Volume Total (mL)
Branco	Branco	0,5	-	4,4	140	8,96	300	-	400
Controle	Controle I	0,5	50	4,4	140	8,96	267,5	-	400
A	Mo [0,5 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	265,5	2	400
A	Mo [0,5 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	265,5	2	400
A	Mo [0,5 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	265,5	2	400
B	Mo [5,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	247,5	20	400
B	Mo [5,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	247,5	20	400
B	Mo [5,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	247,5	20	400
C	Mo [15,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	207,5	60	400
C	Mo [15,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	207,5	60	400
C	Mo [15,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	207,5	60	400
D	Mo [50,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	67,5	200	400
D	Mo [50,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	67,5	200	400
D	Mo [50,0 mg/L]	0,5	50	4,4	140	8,96	67,5	200	400

**Tabela 10-14.** Teste 7. Parâmetros medidos no início e no final da montagem dos testes com diferentes concentrações de molibdato de amônio

<b>Ensaio</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura (Inicial)</b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura (Final)</b>
Branco	7,55	26,7°C	7,43	27,1°C
Controle I	6,84	26,2°C	7,10	30,0°C
Controle II	6,89	26,3°C	6,95	31,0°C
Mo [0,5 mg/L]	6,86	26,6°C	6,94	30,0°C
Mo [0,5 mg/L]	6,90	26,4°C	7,19	30,0°C
Mo [0,5 mg/L]	6,81	26,5°C	7,01	30,0°C
Mo [5,0 mg/L]	6,90	26,6°C	7,02	29,6°C
Mo [5,0 mg/L]	6,86	26,6°C	7,07	30,3°C
Mo [5,0 mg/L]	6,77	26,6°C	6,92	31,4°C
Mo [15,0 mg/L]	6,79	26,8°C	7,00	31,0°C
Mo [15,0 mg/L]	6,90	26,6°C	6,98	29,5°C
Mo [15,0 mg/L]	6,84	26,7°C	7,14	30,2°C
Mo [50,0 mg/L]	6,91	27,0°C	7,08	31,9°C
Mo [50,0 mg/L]	6,92	2,7°C	6,96	30,2°C
Mo [50,0 mg/L]	6,94	26,8°C	7,14	30,0°C

**3) Testes com as combinações dos elementos traço para verificar o efeito aditivo como incremento na produção de metano, ou efeito prejudicial a partir das combinações dos elementos.**

**Tabela 10-15.** Teste 8. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de cloreto de cobalto, ferrico e níquel

Ensaio	Amostra	Relação S/I	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Cobalto (mL)	Ferro (mL)	Níquel (mL)	Água (mL)	Volume Total (mL)
Branco	Branco	0,5	-	5,7	195	11,7	-	-	-	205	400
Controle	Controle I	0,5	60	5,7	195	11,7	-	-	-	145	400
Controle	Controle II	0,5	60	5,7	195	11,7	-	-	-	145	400
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	4	2	4	135	400
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	4	2	4	135	400
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	4	2	4	135	400
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	40	20	4	81	400
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	40	20	4	81	400
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	40	20	4	81	400
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	4	20	40	81	400
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	4	20	40	81	400
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	4	20	40	81	400
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	40	2	4	99	400
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	40	2	4	99	400
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	60	5,7	195	11,7	40	2	4	99	400

**Tabela 10-16.** Teste 8. Parâmetros medidos no início e no final da montagem dos testes com diferentes concentrações de cobalto, ferro e níquel

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura(inicial)</b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura(final)</b>
Br	Branco	7,85	25,7°C	7,85	25,8°C
Controle I	Controle I	7,21	25,3°C	7,71	25,0°C
Controle II	Controle II	7,32	25,7°C	7,73	25,7°C
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,21	26,2°C	7,71	25,9°C
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,24	26,0°C	7,71	25,8°C
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,24	25,9°C	7,71	25,7°C
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,24	25,8°C	7,72	25,9°C
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,26	25,9°C	7,70	26,0°C
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,30	25,8°C	7,72	25,8°C
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,23	25,9°C	7,76	25,7°C
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,33	26,5°C	7,79	25,8°C
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,21	26,4°C	7,82	25,4°C
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,25	26,4°C	7,75	25,7°C
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,25	26,0°C	7,76	25,8°C
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,26	26,1°C	7,73	25,6°C

**Tabela**

**10-17.**

Teste 9. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de cobalto, ferro e níquel

Ensaio	Amostra	Relação S/I	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Cobalto (mL)	Ferro (mL)	Níquel (mL)	Água (mL)	Volume Total (mL)
Branco	Branco	1,5	-	-	150	6,37	-	-	-	250	400
Controle	Controle I	1,5	100	9,6	150	6,37	-	-	-	150	400
Controle	Controle II	1,5	100	9,6	150	6,37	-	-	-	150	400
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	4	2	4	140	400
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	4	2	4	140	400
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	4	2	4	140	400
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	40	20	4	86	400
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	40	20	4	86	400
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	40	20	4	86	400
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	4	20	40	86	400
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	4	20	40	86	400
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	4	20	40	86	400
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,6	150	6,37	40	2	4	104	400
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,4	150	6,37	40	2	4	104	400
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	100	9,4	150	6,37	40	2	4	104	400

**Tabela 10-18.** Teste 9. Parâmetros medidos no início e no final da montagem dos testes com diferentes concentrações de cobalto, ferro e níquel

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura<sub>(inicial)</sub></b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura<sub>(final)</sub></b>
Br	Branco	7,91	25,4°C	7,41	28,4°C
Controle I	Controle I	7,32	25,2°C	7,29	28,9°C
Controle II	Controle II	7,33	25,6°C	7,34	29,0°C
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,36	25,9°C	7,51	29,2°C
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,39	25,7°C	7,52	29,4°C
A	Co [1,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,31	25,6°C	7,52	28,6°C
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,52	25,5°C	7,46	29,1°C
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,58	25,5°C	7,49	29,2°C
B	Co [10,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,44	25,6°C	7,42	29,1°C
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,21	25,1°C	7,42	29,0°C
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,27	25,6°C	7,37	29,0°C
C	Co [1,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,23	25,6°C	7,45	28,9°C
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,48	24,9°C	7,53	29,1°C
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,56	25,7°C	7,53	29,3°C
D	Co [10,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,54	25,6°C	7,42	29,1°C

**Tabela 10-19.** Teste 10. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de molibdênio, ferro e níquel

Ensaio	Amostra	Relação S/I	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Molibdênio (mL)	Ferro (mL)	Níquel (mL)	Água (mL)	Volume Total (mL)
Branco	Branco	0,5	-	-	220	12,43	-	-	-	180	400
Controle	Controle I	0,5	70	5,88	220	12,43	-	-	-	110	400
Controle	Controle II	0,5	70	5,88	220	12,43	-	-	-	110	400
A	Mo [0,5mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	2	2	4	102	400
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	2	2	4	102	400
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	2	2	4	102	400
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	20	20	4	66	400
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	20	20	4	66	400
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	20	20	4	66	400
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	2	20	40	48	400
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	2	20	40	48	400
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	2	20	40	48	400
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	20	2	4	84	400
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	20	2	4	84	400
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	0,5	70	5,88	220	12,43	20	2	4	84	400

**Tabela 10-20.** Teste 10. Parâmetros medidos no início e no final da montagem do teste com diferentes concentrações de molibdênio, ferro e níquel

<b>Ensaio</b>	<b>Amostra</b>	<b>pH (Inicial)</b>	<b>Temperatura</b>	<b>pH (Final)</b>	<b>Temperatura<sub>(final)</sub></b>
Br	Branco	7,71	21,0°C	7,57	27,3°C
Controle I	Controle I	6,94	21,4°C	7,56	27,3°C
Controle II	Controle II	6,91	21,6°C	7,55	27,2°C
A	Mo [ 0,5mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	6,97	23,8°C	7,57	27,2°C
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	6,90	23,0°C	7,65	26,7°C
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	6,92	22,8°C	7,61	27,1°C
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	6,85	22,6°C	7,69	27,0°C
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	6,91	22,2°C	7,60	27,7°C
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	6,89	23,0°C	7,65	27,3°C
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	6,84	23,8°C	7,62	27,4°C
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	6,87	23,4°C	7,56	27,3°C
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	6,89	23,4°C	7,58	27,2°C
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,05	23,5°C	7,66	27,5°C
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	6,98	22,9°C	7,59	26,7°C
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,03	23,5°C	7,64	27,3°C

**Tabela 10-21.** Teste 11. Massas e volumes utilizados na montagem do teste com diferentes concentrações de molibdênio, ferro e níquel

Ensaio	Amostra	Relação S/I	Substrato (mL)	Massa Substrato (gSV)	Inóculo (mL)	Massa Inóculo (gSV)	Molibdênio (mL)	Ferro (mL)	Níquel (mL)	Água (mL)	Volume Total (mL)
Branco	Branco	1,5	-	-		10,05	-	-	-	250	400
Controle	Controle I	1,5	163	14,99	150	10,05	-	-	-	87	400
Controle	Controle II	1,5	163	14,99	150	10,05	-	-	-	87	400
A	Mo [0,5mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	2	2	4	79	400
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	2	2	4	79	400
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	2	2	4	79	400
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	20	20	4	43	400
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	20	20	4	43	400
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	20	20	4	43	400
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	2	20	40	25	400
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	2	20	40	25	400
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	2	20	40	25	400
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	20	2	4	61	400
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	20	2	4	61	400
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	1,5	163	14,99	150	10,05	20	2	4	61	400

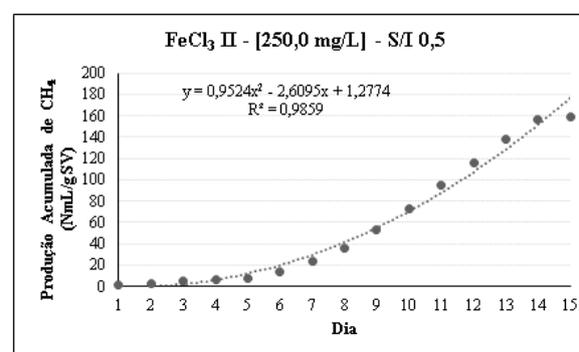
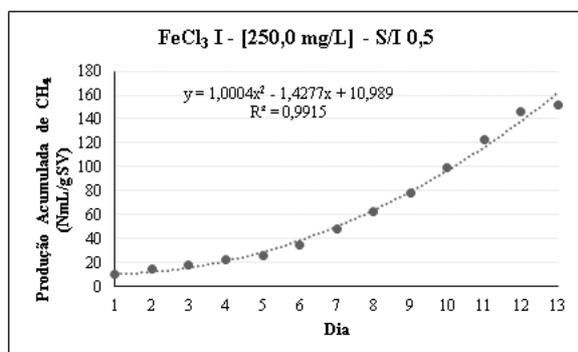
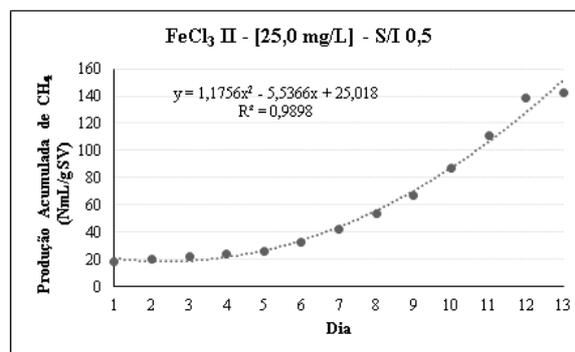
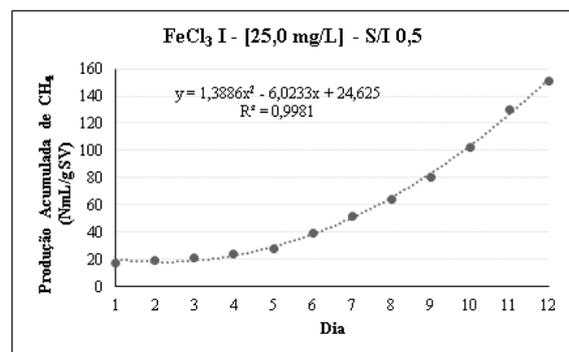
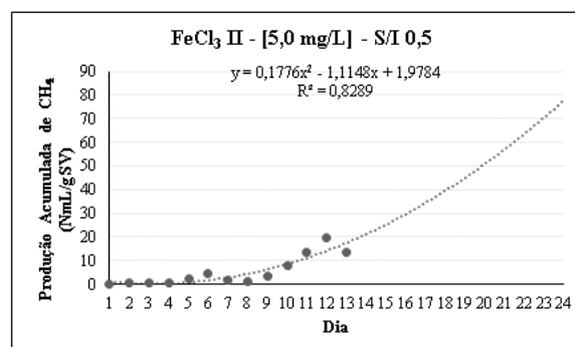
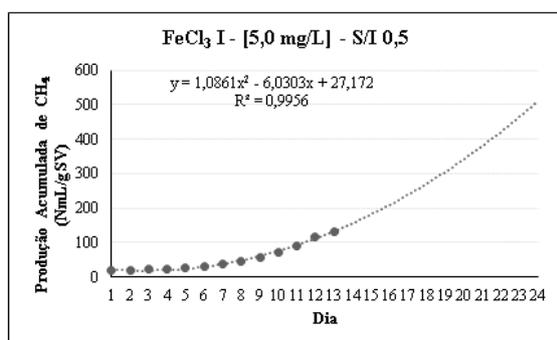
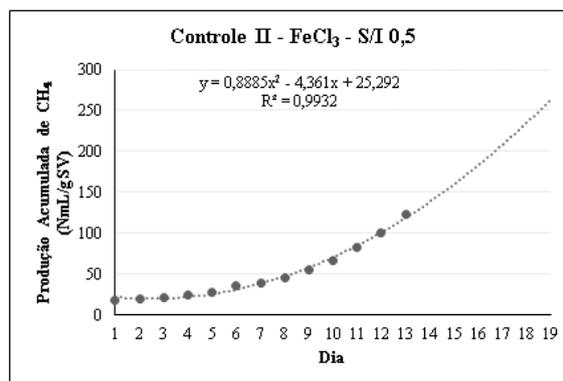
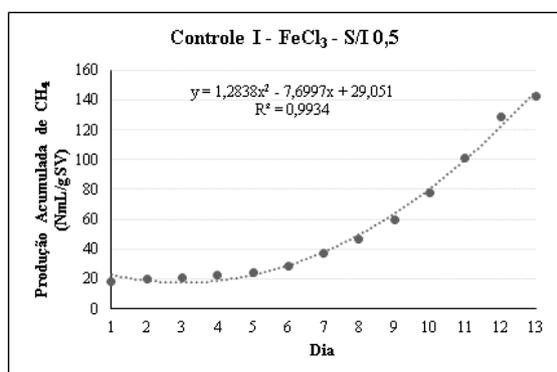
**Tabela 10-22.** Teste 11. Parâmetros medidos no início e no final da montagem dos testes com diferentes concentrações de molibdênio, ferro e níquel

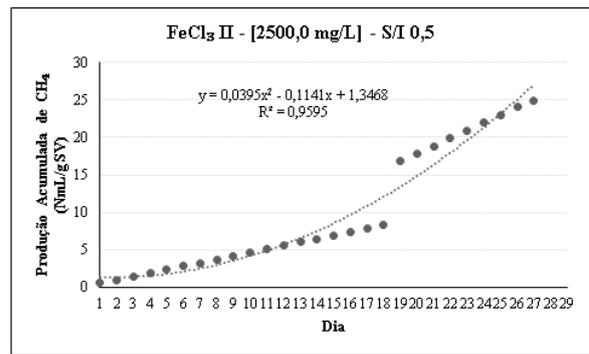
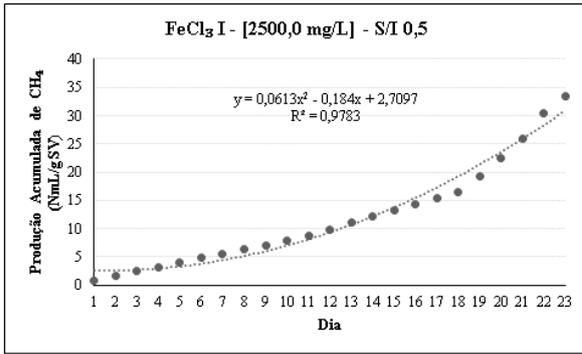
Ensaio	Amostra	pH <sub>(Inicial)</sub>	Temperatura	pH <sub>(Final)</sub>	Temperatura <sub>(final)</sub>
Br	Branco	6,59	20,7°C	7,53	28,6°C
Controle I	Controle I	6,91	25,8°C	7,40	28,7°C
Controle II	Controle II	7,10	25,6°C	7,39	28,5°C
A	Mo [ 0,5mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,16	26,9°C	7,46	28,8°C
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,10	25,7°C	7,49	28,5°C
A	Mo [0,5 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,16	25,6°C	7,42	28,1°C
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,16	25,9°C	7,44	28,4°C
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,10	25,6°C	7,45	28,6°C
B	Mo [5,0 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,10	25,5°C	7,42	28,4°C
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,24	25,1°C	7,40	28,4°C
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,10	26,6°C	7,45	28,3°C
C	Mo [0,5 mg/L], Fe [50,0 mg/L], Ni [5,0 mg/L]	7,26	26,8°C	7,43	28,1°C
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,30	24,9°C	7,41	28,2°C
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,23	25,7°C	7,63	28,2°C
D	Mo [5,0 mg/L], Fe [5,0 mg/L], Ni [0,5 mg/L]	7,21	25,6°C	7,47	28,2°C

## 10.2 Resultados Complementares Após Testes - Objetivo específico 2

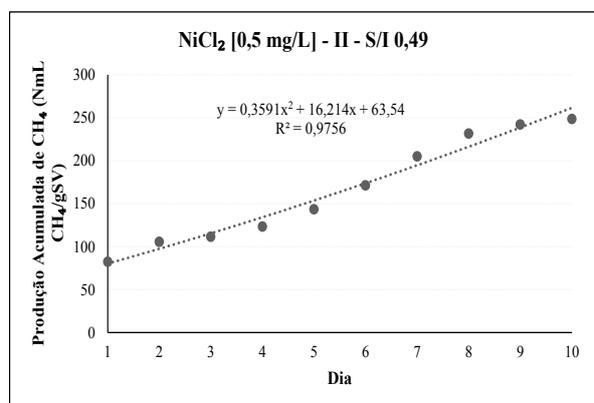
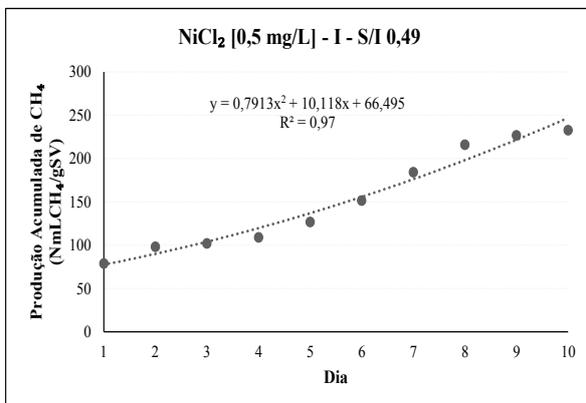
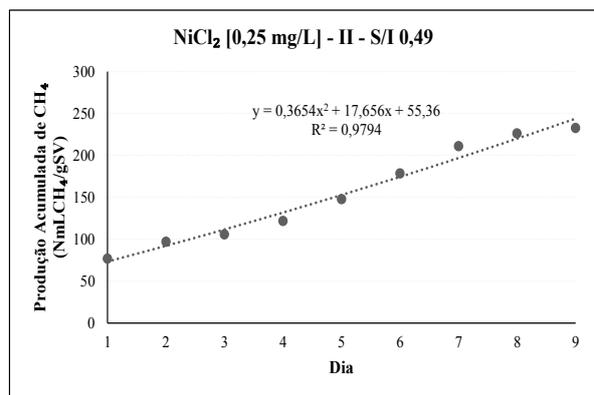
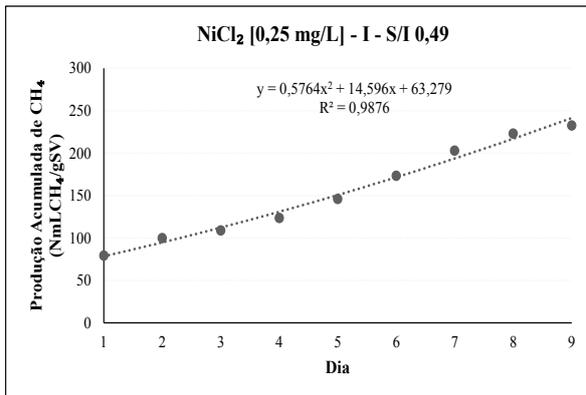
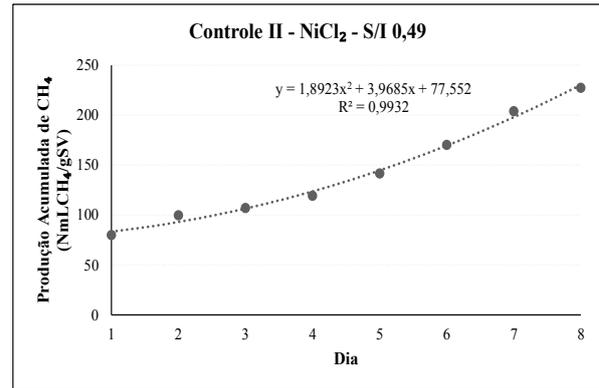
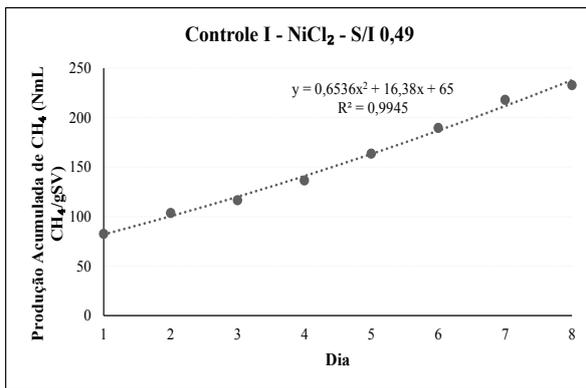
### 10.2.1 Gráficos linha de tendência

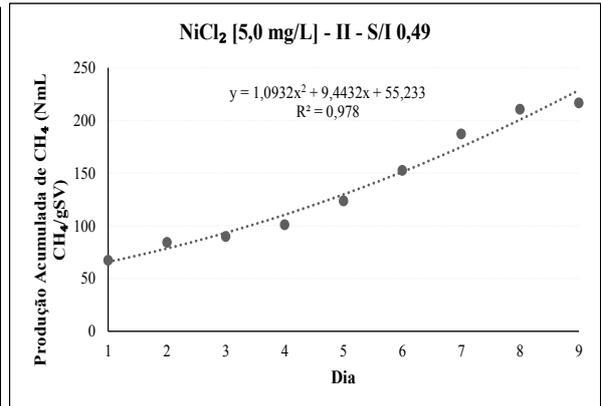
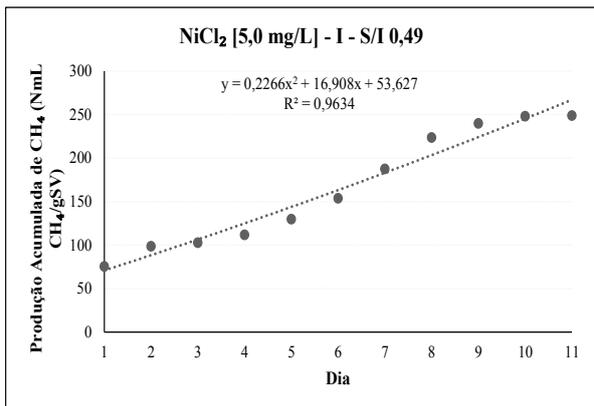
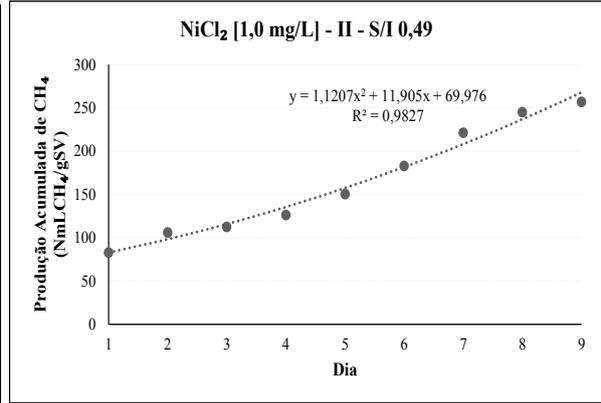
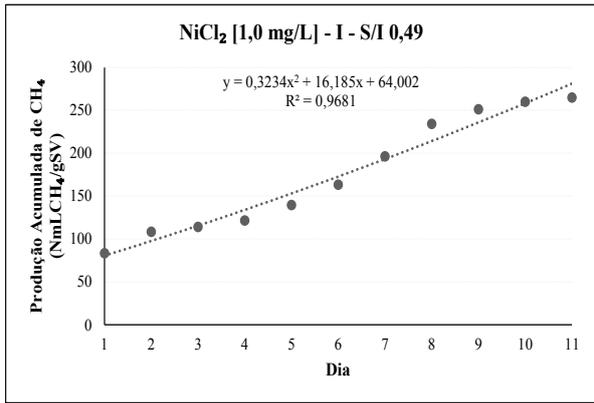
#### a. Testes com Adição de Cloreto Férrico



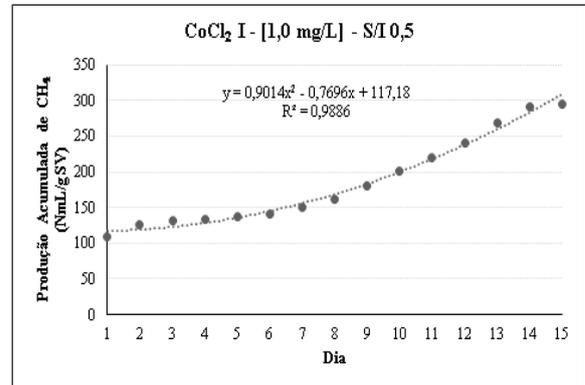
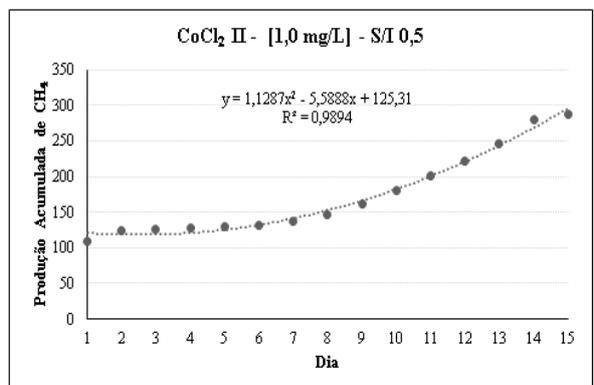
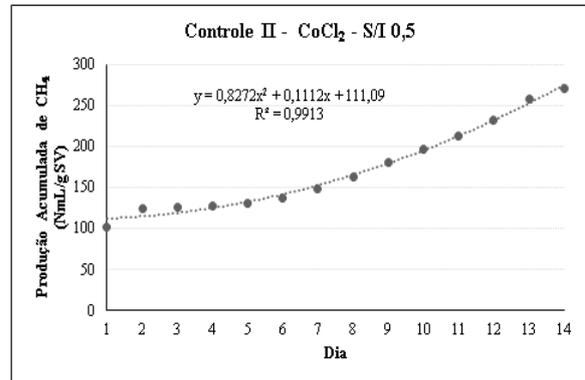
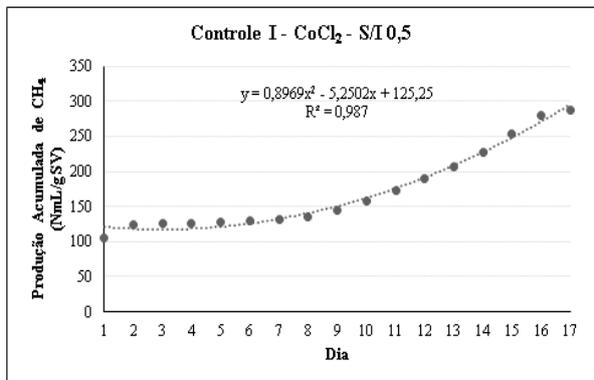


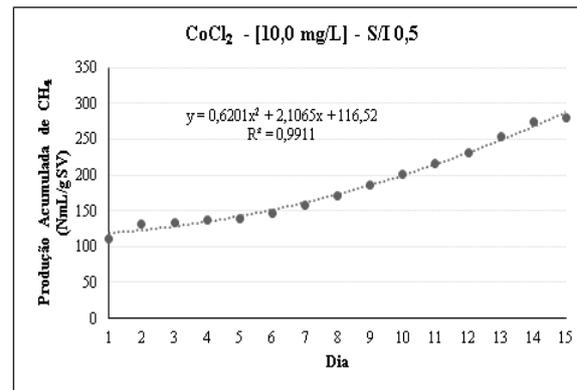
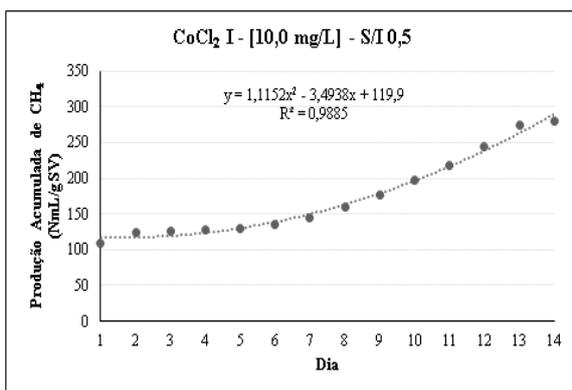
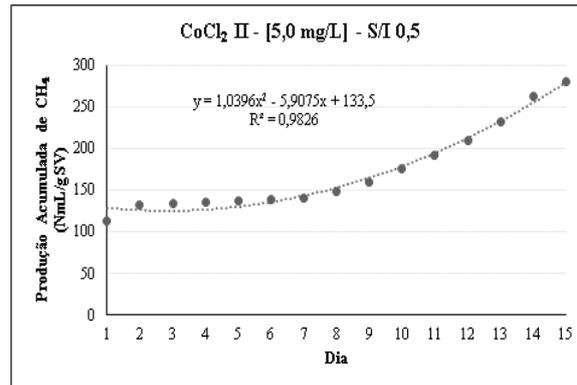
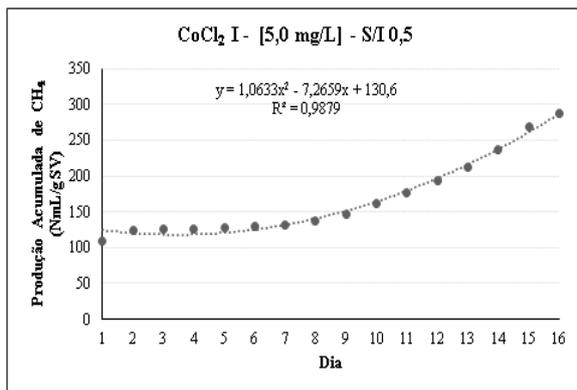
## b. Teste com Adição de Cloreto de Níquel



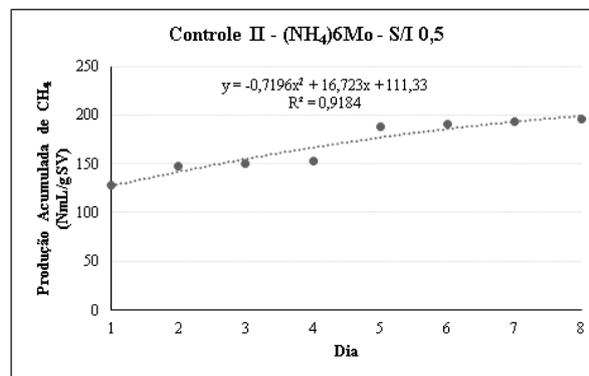
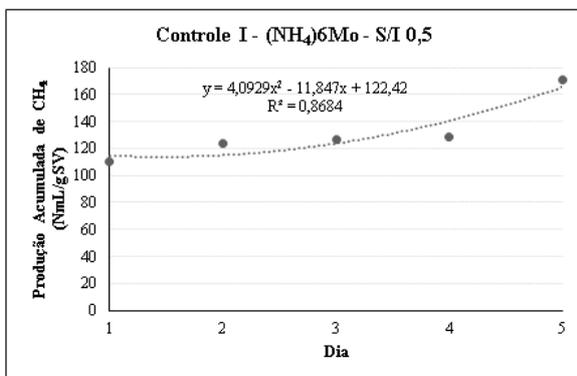
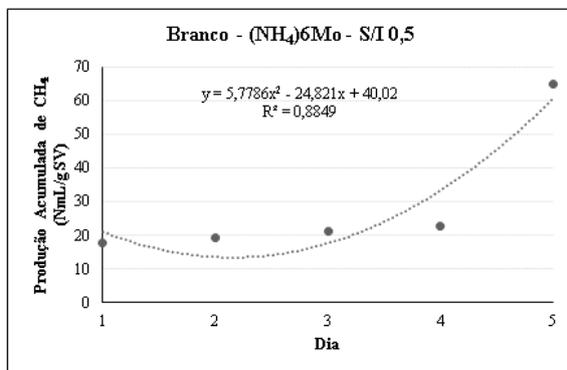


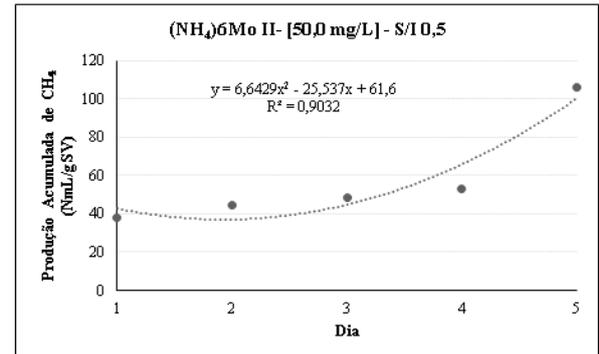
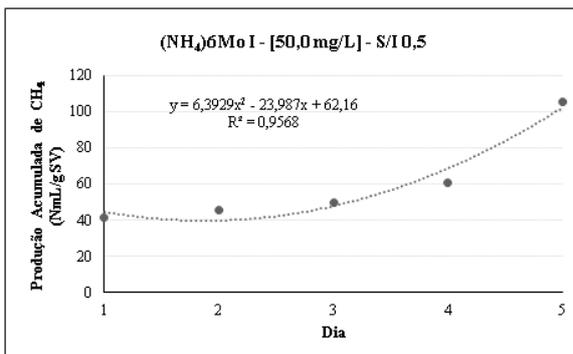
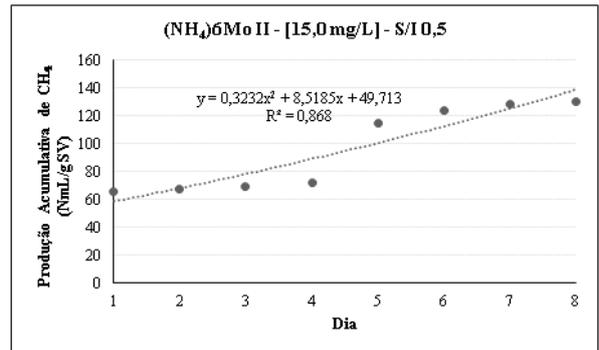
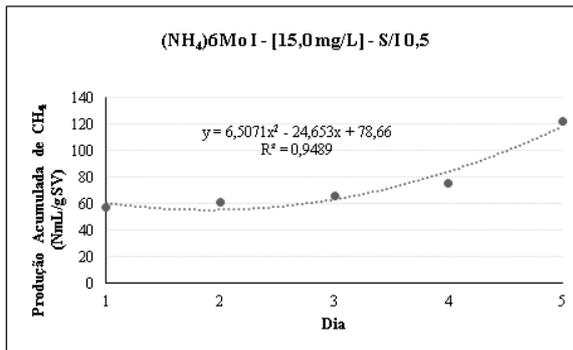
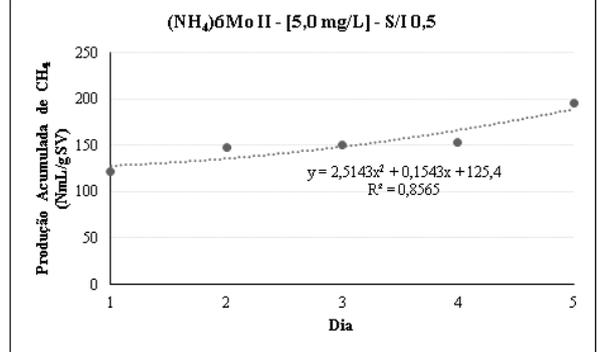
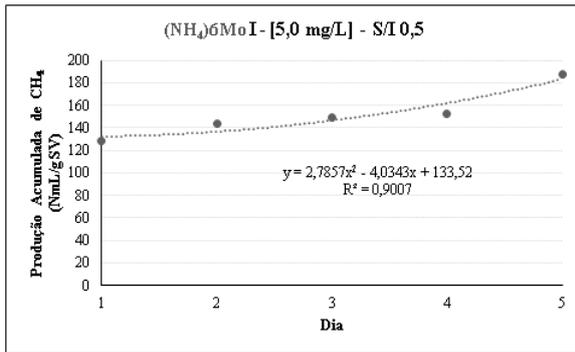
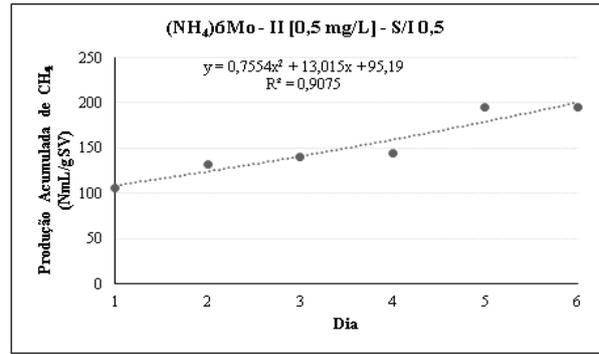
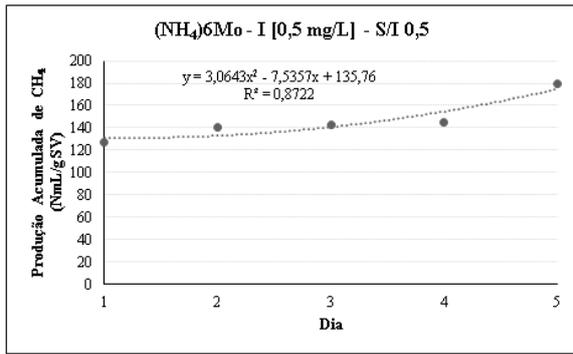
### c. Teste com Adição de Cloreto de Cobalto



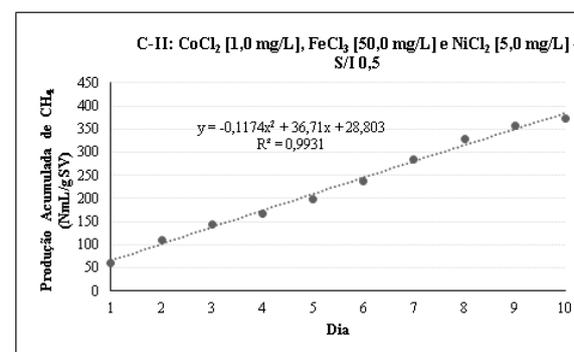
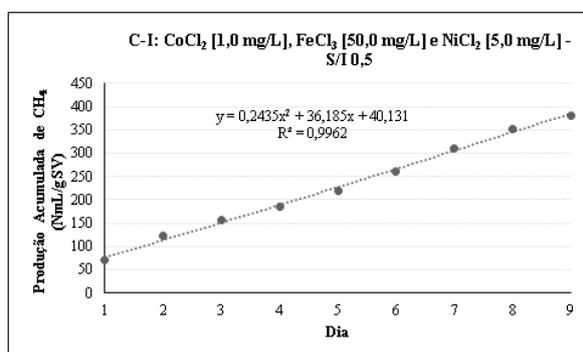
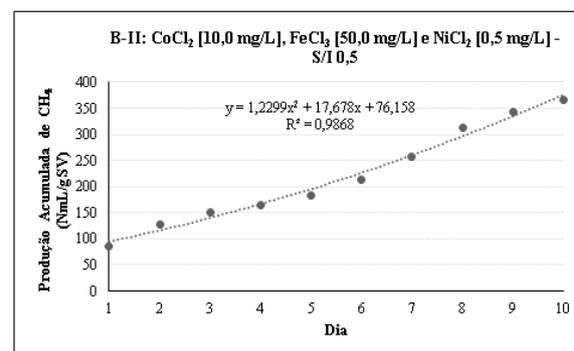
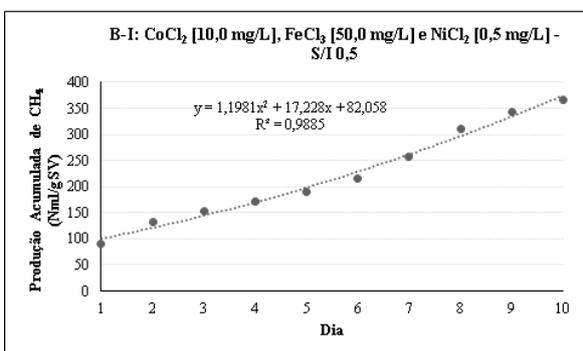
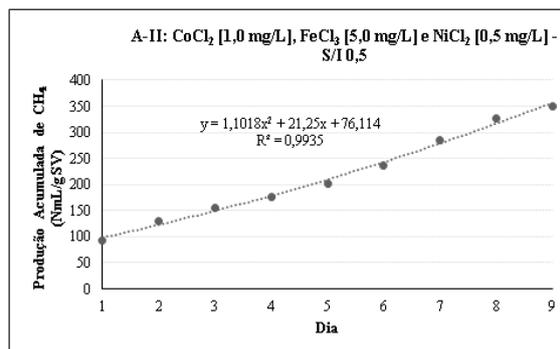
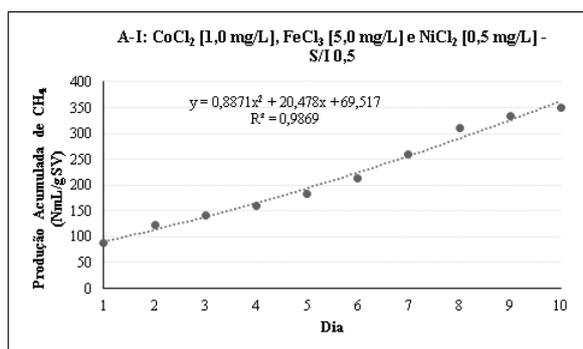
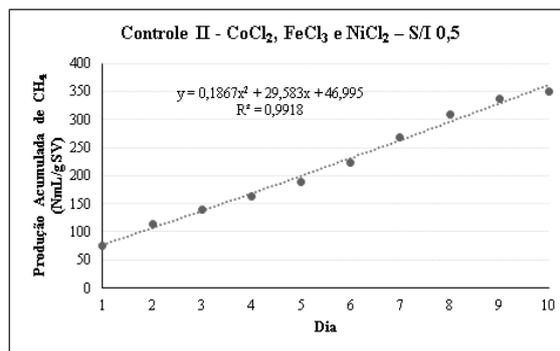
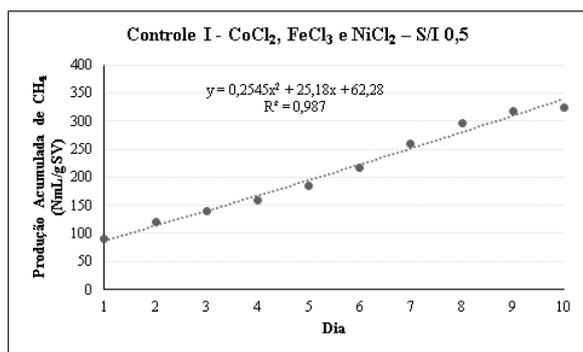


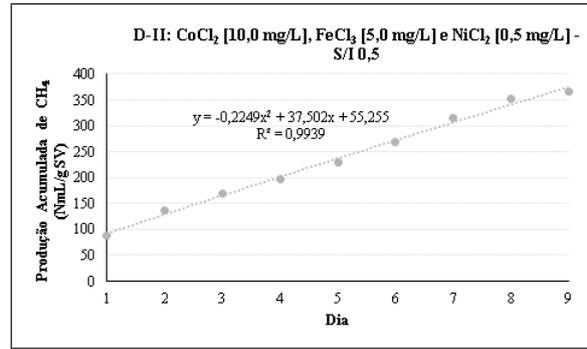
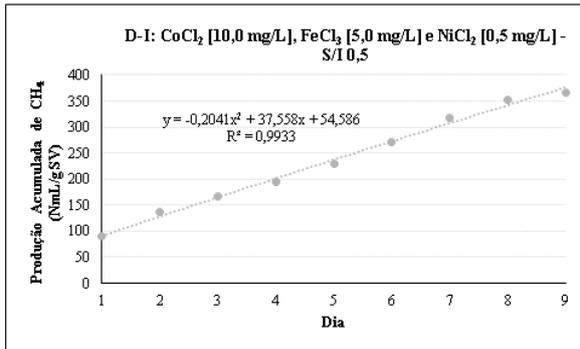
#### d. Teste com Adição de Molibdato de Amônio



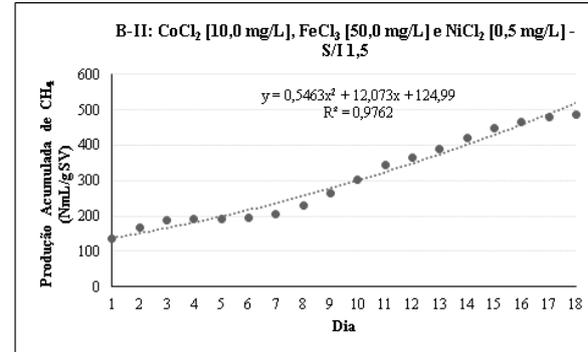
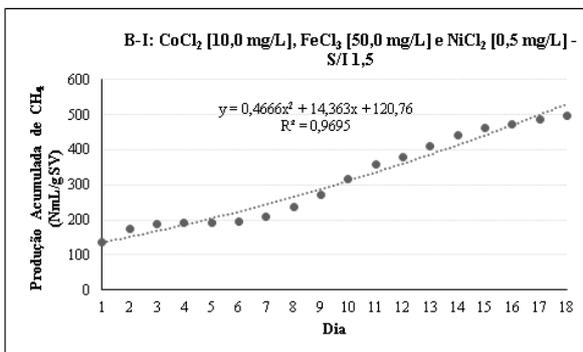
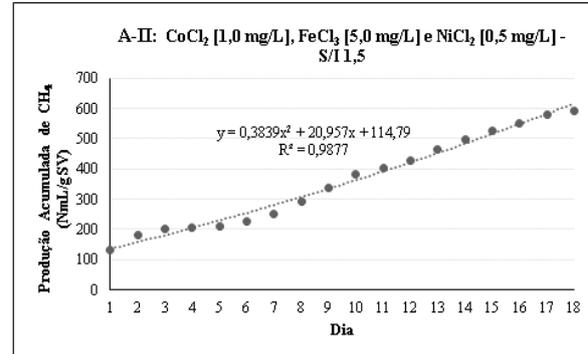
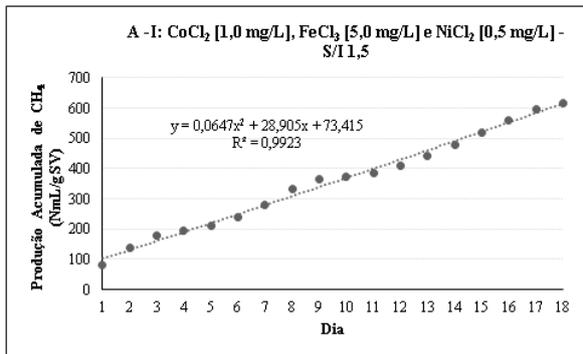
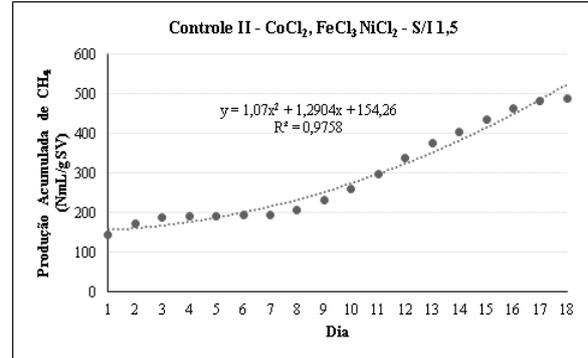
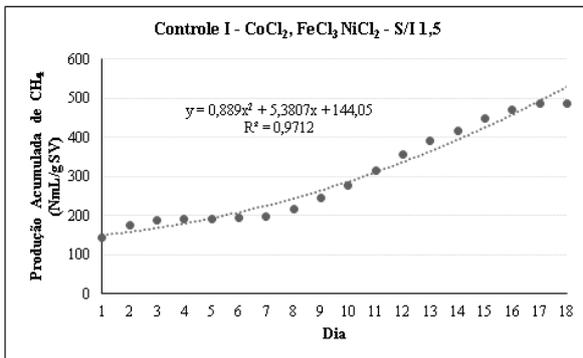


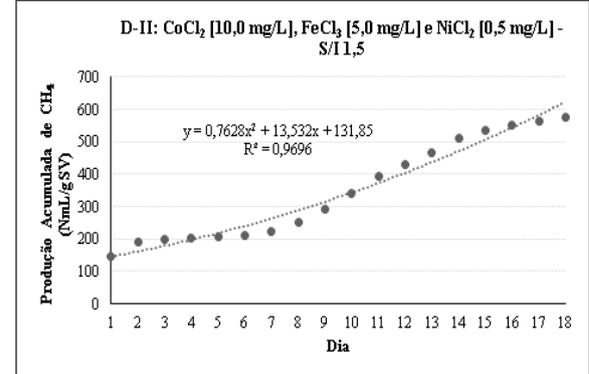
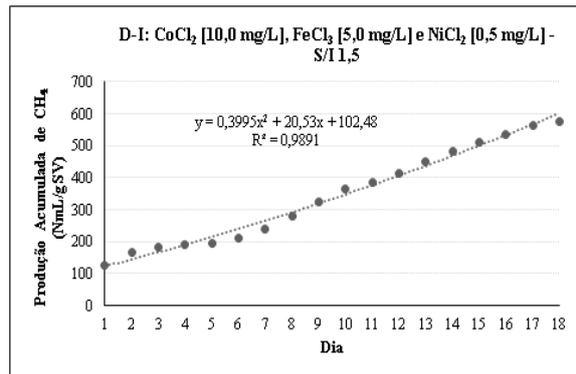
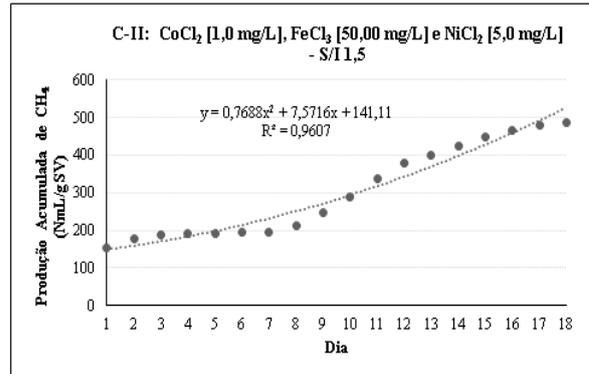
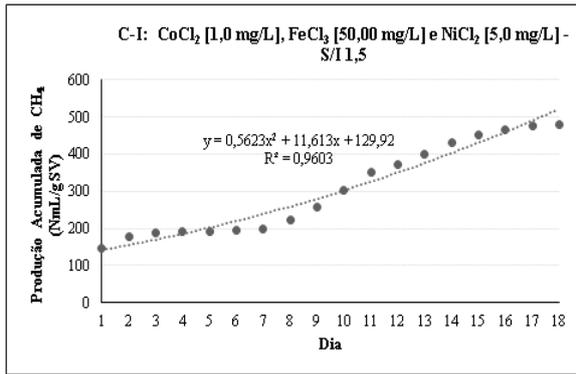
### e. Teste com Adição de $\text{CoCl}_2$ , $\text{FeCl}_3$ e $\text{NiCl}_2$ – S/I 0,5



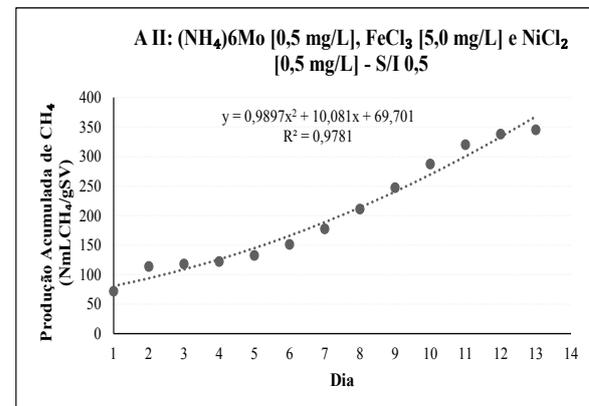
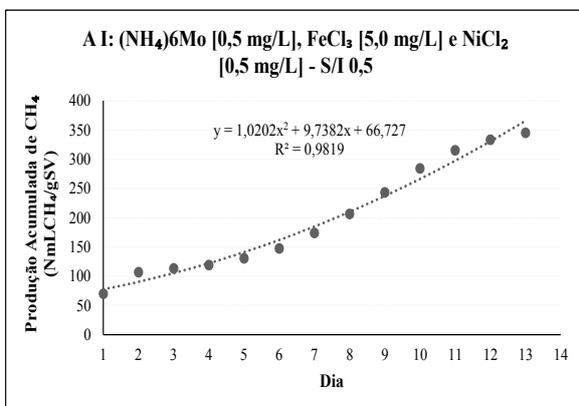
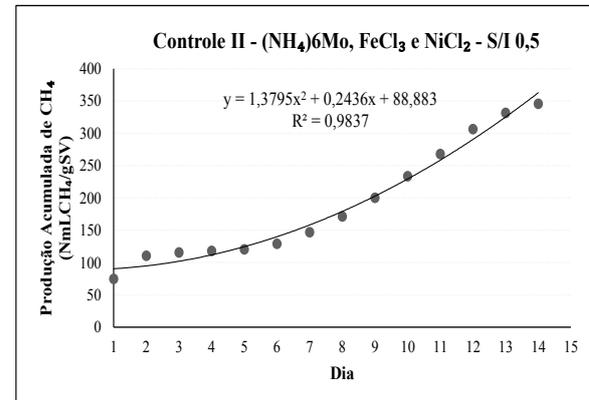
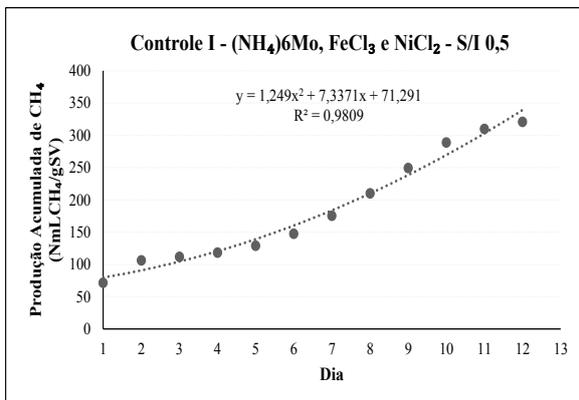


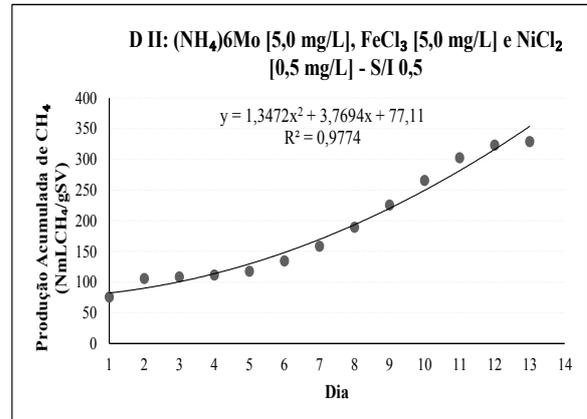
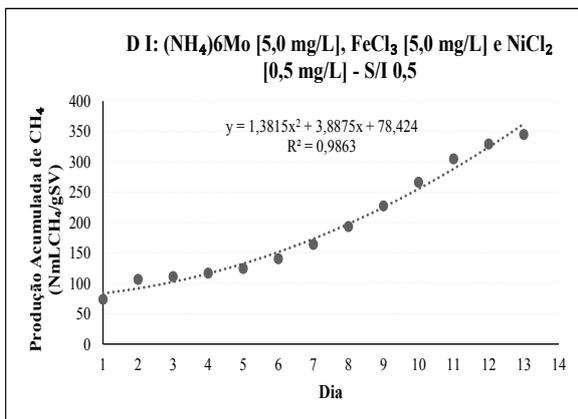
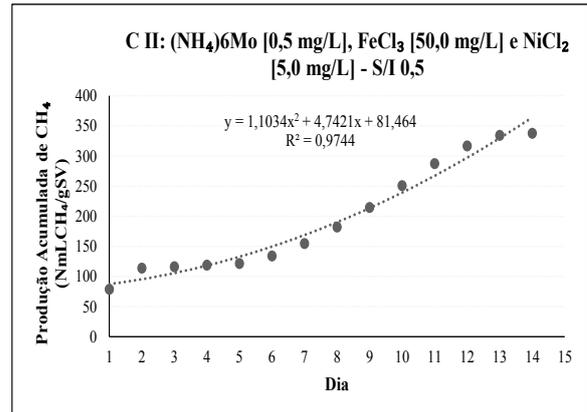
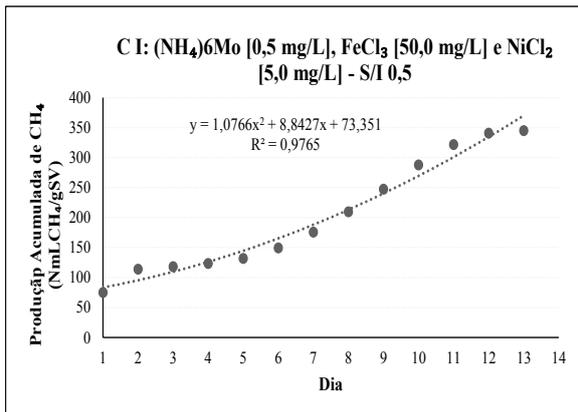
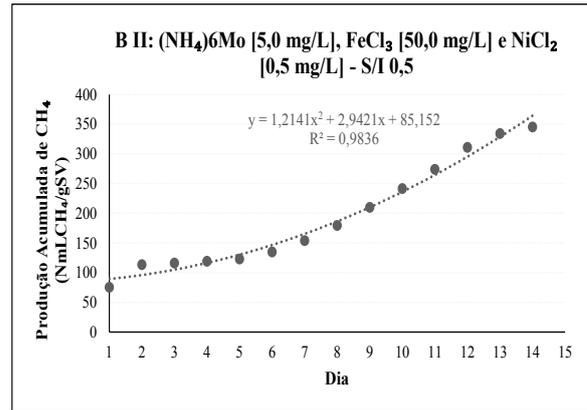
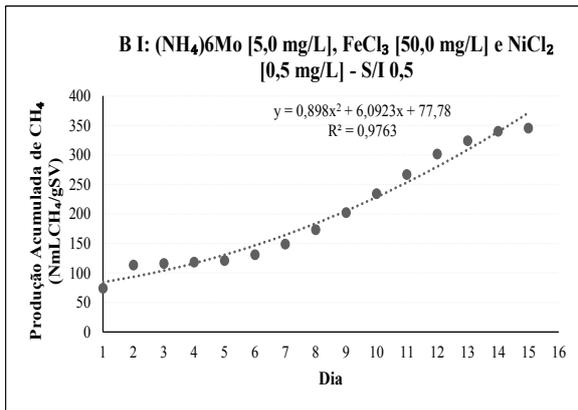
## f. Teste com Adição de $\text{CoCl}_2$ , $\text{FeCl}_3$ e $\text{NiCl}_2$ – S/I 1,5



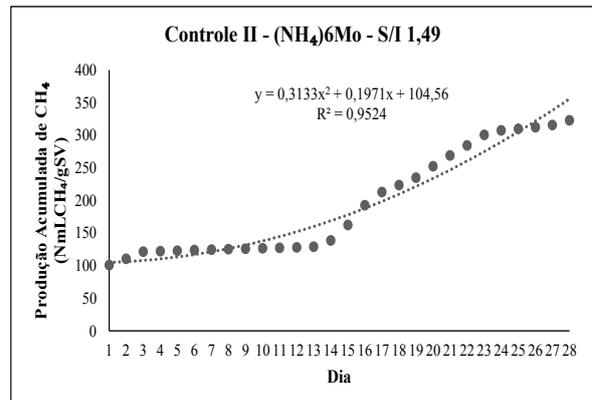
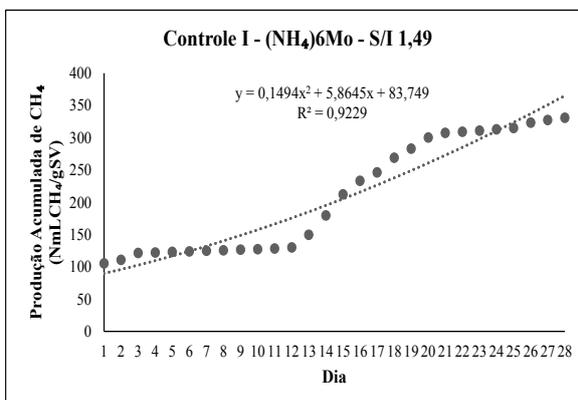


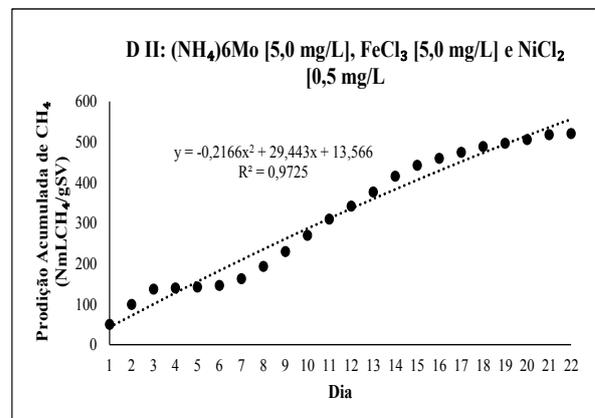
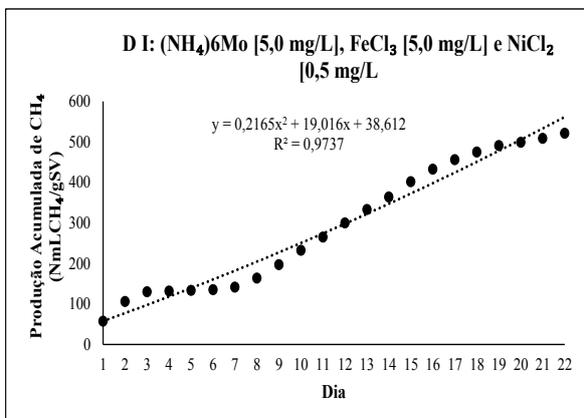
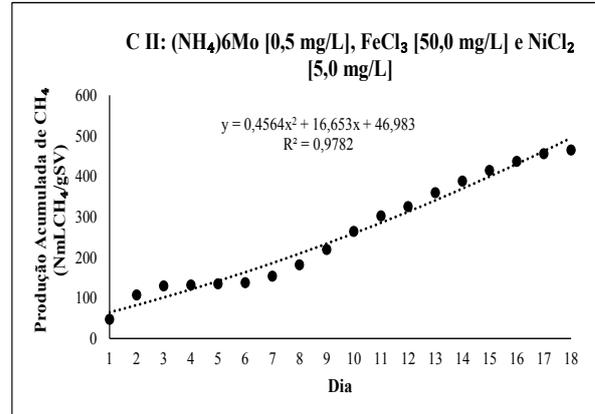
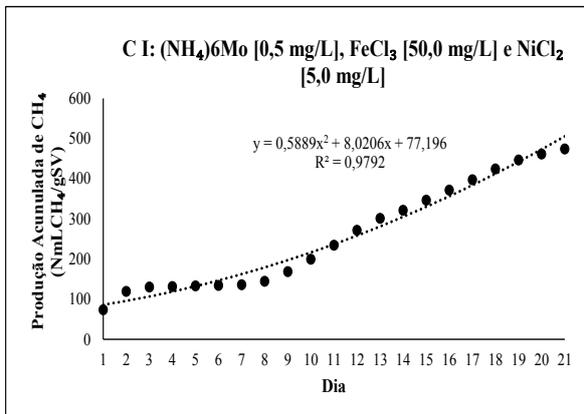
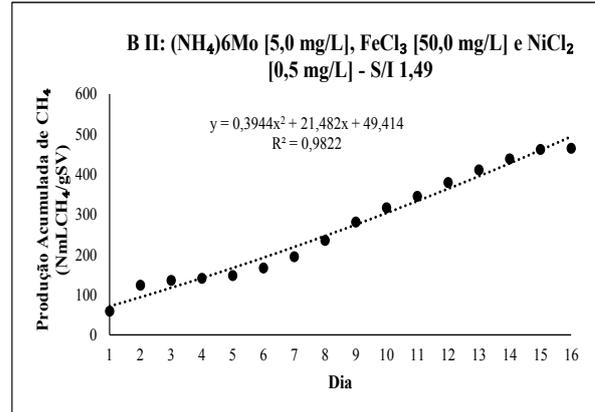
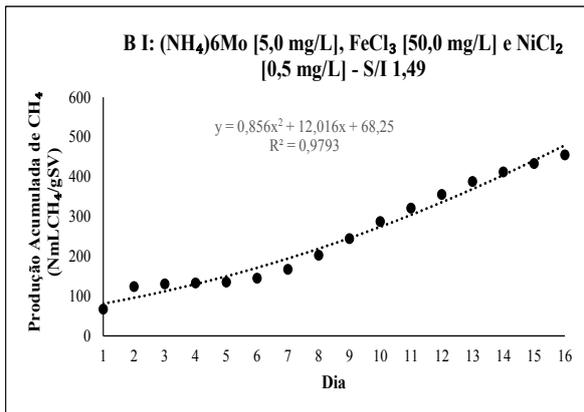
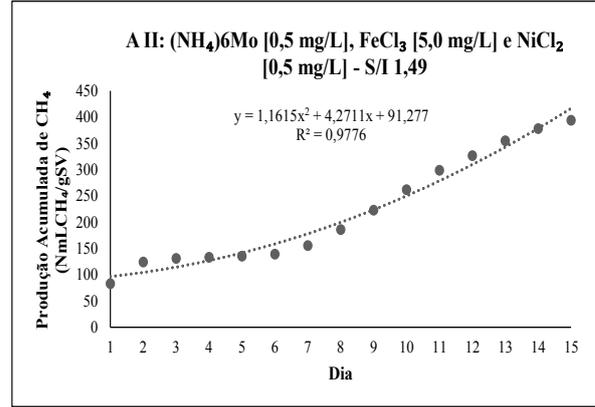
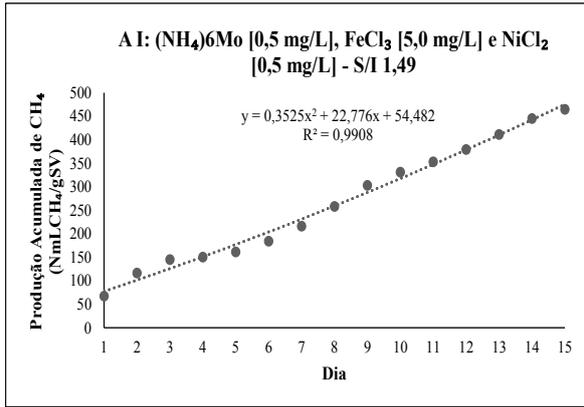
**g. Teste com Adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo, FeCl<sub>3</sub> e NiCl<sub>2</sub> – S/I 0,5**





### h. Teste com Adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo, FeCl<sub>3</sub> e NiCl<sub>2</sub> - S/I 1,5





## 11 ANEXO

### *11.1 Sistema Automático Potencial Teste de Metano*

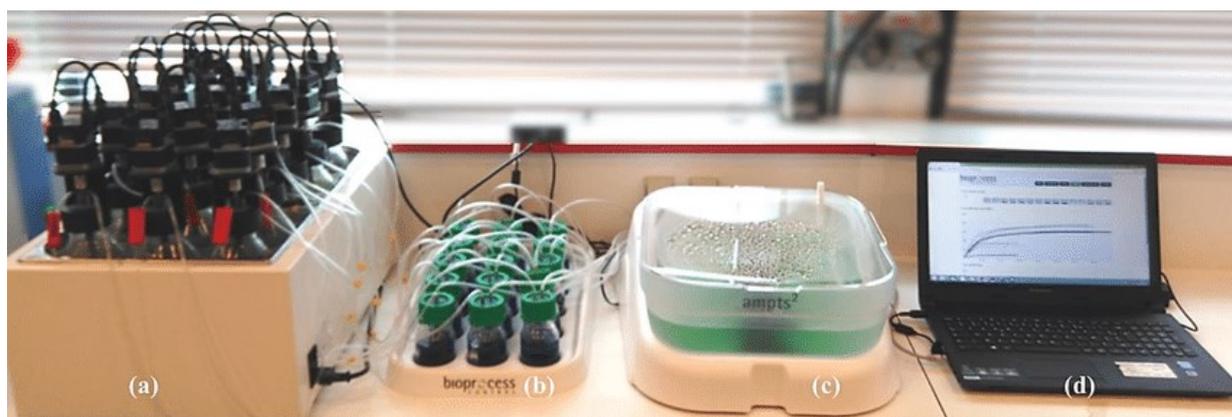
O sistema AMPTS (do inglês “Automatic Methane Potential Test System) II é um dispositivo analítico bem projetado desenvolvido para medições on-line de metano com fluxos ultrabaixo, produzidos a partir da digestão anaeróbia de qualquer substrato biodegradável em escala laboratorial. O AMPTS II segue os mesmos princípios de análise que os testes de potencial de metano convencional, os resultados são totalmente comparáveis com métodos comuns. Contudo, com o AMPTS II, as medidas do volume de gás e o registro de dados são totalmente automáticos durante o período de incubação, e os dados experimentais são calculados e gerados em uma planilha de dados padrão.

A alta qualidade dos dados obtidos do AMPTS II pode ser usada para extrair informações cinéticas da degradação do processo, o que, por sua vez, proporciona melhor compreensão da dinâmica de comportamento da degradação do substrato específico. O AMPTS II oferece as seguintes vantagens:

- Procedimento analítico automatizado que reduz o trabalho de carga;
- Interface conhecida para configuração de experiências, exibição de dados em tempo real e visão geral de análise dos registros de dados em tempo real, e em tempo real do biometano total produção e taxa de fluxo;
- Pressão e temperatura automáticas em tempo real compensação por medições de volume;
- Normalização de fluxo e volume de gás em tempo real;
- Opção algoritmo para evitar uma sobre-estimação de volume e fluxo de gás (que podem ser induzidos pelo flash do gás durante a configuração experimental);
- Possibilidade de multiplexação, permitindo análise simultânea em batelada em diferentes horários de inicialização;
- Extração de dados de alta qualidade para formação de processo cinético;
- Instrumento autônomo com aquisição de dados incorporados e servidor web para acesso remoto;
- Baixa e fácil manutenção.

## 11.2 Configurações do AMPTS II

A configuração do instrumento pode ser dividida em três unidades: A, B, C e D. Na unidade A (unidade de incubação da amostra), são incubados até uma batelada de 15 frascos de vidro de 600 mL do tipo Shott, contendo pequenas quantidades de uma amostra com inóculo anaeróbico a uma temperatura desejada, imergido em banho-maria. Cada frasco é misturado por um agitador rotativo lento. O Biogás é continuamente produzido, parâmetro que é usado para estimar a atividade de biometanização dentro de cada frasco (Figura 6).



**Figura 11.1-** Sistema AMPTS

Na unidade B (unidade de fixação de  $\text{CO}_2$ ), o biogás produzido em cada frasco passa por um frasco individual contendo uma solução alcalina de NaOH a 3 M. Várias frações de gás ácido, tais como  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{S}$ , são retidos por interação química com NaOH 3 M, permitindo apenas a passagem de  $\text{CH}_4$  para a unidade de monitoramento de gás de biometano. Um indicador de pH (timolftaleína) é adicionado em cada frasco para controlar a capacidade de ligação de ácido da solução. Compõem esta unidade 15 frascos de vidro de 80 mL do tipo Shott (Figura 6).

Na unidade C (dispositivo de medição do volume de gás), o volume de gás  $\text{CH}_4$  liberado da unidade B é medido usando um dispositivo de medição de fluxo de gás úmido com uma disposição de células de fluxo múltiplo (15 células). Este dispositivo de medição funciona de acordo com o princípio do deslocamento de líquidos e da flutuabilidade e pode monitorar fluxos de gás ultrabaixos (2 mL); um pulso digital é gerado quando um volume de gás definido flui através do dispositivo. Um sistema integrado de aquisição de dados é usado para gravar, exibir e analisar os resultados (Figura 6).

Unidade D (computador), com uso de um computador e ancoragem de um cabo de conexão com o sistema, os dados podem ser visualizados, monitorados e baixados para posteriores análises.

### 11.3 Cálculo de Normalização de Gás no AMPTS-II

Para comparação com outros trabalhos, os valores de dados gerados a partir do AMPTS II são normalizados para condição padrão, isto é, convertido a 0°C, 1 atm e zero de umidade com remoção do teor de água e considerado o gás seco. Isto é realizado aplicando a equação (1):

$$V_0 = f_{T,P} \times f_w \times V_{cell} \quad \text{Equação (1)}$$

quando o volume é normalizado ( $V_0$ ), considerando os fatores de temperatura e de pressão do gás ( $f_{T,P}$ ), o fator do teor de água no gás ( $f_w$ ) e o volume é registrado por uma abertura de célula ( $V_{cell}$ ).

#### (i) Temperatura e Pressão

O fator que considera a temperatura e a pressão ( $f_{T,P}$ ) é calculado aplicando a lei de gás ideal assumida, para descrever as características físicas do gás dentro de intervalos da temperatura e pressão utilizados em teste de digestão anaeróbia  $f_{T,P}$ , é calculado de acordo com a equação (2):

$$f_{TP} = \frac{T_0}{T_{gas}} \times \frac{p_{gas}}{p_0} = \frac{273,15}{t_{gas}+273,15} \times \frac{(p_{gas}+0,6)}{101,32} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde o padrão da temperatura ( $T_0$ ) e da pressão ( $p_0$ ) equivalem a 273,15 K ou 0 °C e da pressão 101,32kPa ou 1 atm respectivamente,  $T_{gas}$ ,  $t_{gas}$  e  $p_{gas}$  representam a temperatura em Kelvin ou graus Celsius (°C) e a pressão do gás gerado no reator em condições ambientais. Estes valores são obtidos a partir de sensores internos da temperatura e da pressão do AMPTS II, e são atualizadas para cada abertura de célula. A pressão do gás é a soma da pressão medida expressa em Kpa, e fator constante igual a 0,6, pressão exercida por cerca de 6 cm de coluna de água a partir do dispositivo de medição do volume de gás.

#### (ii) Vapor de Água

O fator considerando o teor de água no gás ( $f_w$ ) é calculado usando a equação de Antoine que assume fornecer uma boa aproximação do vapor em torno da pressão atmosférica e no intervalo da temperatura de 0 a 100 °C,  $f_w$  é calculado de acordo com a equação (3):

$$f_w = 1 - \frac{p_{vap}}{p_{gas}} = 1 - \frac{10^{\frac{8,1962 - \frac{1730,63}{233,426 + t_{gas}}}}}{10 \times (p_{gas} + 0,6)} \quad \text{Equação (3)}$$

Na equação acima é assumido que a pressão de vapor do gás é proporcional com o volume do gás, de acordo com lei do gás 'ideal'. A fração volumétrica da água é então equivalente a fração da pressão obtida pela divisão da pressão do vapor de água com a pressão total. A fração do gás seco pode então ser calculada pela remoção da fração de água do estado úmido do gás:

$$V_{0,i} = \frac{273,15}{t_{gas,i} + 273,15} \times \frac{p_{gas,i}}{101,32} \times \left( 1 - \frac{10^{\frac{8,1962 - \frac{1730,63}{233,426 + t_{gas,i}}}}}{10 \times (p_{gas,i} + 0,6)} \right) \times V_{cell} \quad \text{Equação (4)}$$

O volume acumulado reportado pelo AMPTS II é calculado equação 5

$$V_{acc,i} = V_{acc,i-1} + \frac{273,15}{t_{gas,i} + 273,15} \times \frac{p_{gas,i}}{101,32} \times \left( 1 - \frac{10^{\frac{8,1962 - \frac{1730,63}{233,426 + t_{gas,i}}}}}{10 \times (p_{gas,i} + 0,6)} \right) \times V_{cell} \quad \text{Equação (5)}$$