



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

SÁVIO HENRIQUE DE BARROS HOLANDA

APLICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO NA BIODEGRADAÇÃO
ANAERÓBIA E GERAÇÃO DE BIOMETANO DE RESÍDUOS SÓLIDOS
ORGÂNICOS

Recife

2022

SÁVIO HENRIQUE DE BARROS HOLANDA

**APLICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO NA BIODEGRADAÇÃO
ANAERÓBIA E GERAÇÃO DE BIOMETANO DE RESÍDUOS SÓLIDOS
ORGÂNICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil.

Área de concentração: Geotecnia.

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Thomé Jucá.

Coorientadora: Prof. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva.

Recife

2022

H722a Holanda, Sávio Henrique de Barros.
Aplicação do consórcio microbiano na biodegradação anaeróbia e
geração de biometano de resíduos sólidos orgânicos / Sávio Henrique
de Barros Holanda, 2023.
119 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Thomé Jucá.
Coorientadora: Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Recife, 2023.
Inclui referências.

1. Engenharia Civil. 2. Biomassa. 3. Energia renovável. 4.
Fermentação anaeróbia. 5. Bioenergia. 6. Consórcio microbianos. 7.
Energia verde. I. Jucá, José Fernando Thomé (Orientador). II. Silva,
Leonor Alves de Oliveira da (Coorientadora). III. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG / 2023 - 239

SÁVIO HENRIQUE DE BARROS HOLANDA

**APLICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO NA BIODEGRADAÇÃO
ANAERÓBIA E GERAÇÃO DE BIOMETANO DE RESÍDUOS SÓLIDOS
ORGÂNICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Geotecnia.

Aprovado em: 14 /12/ 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Alves da Motta Sobrinho (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Armando Borges de Castilhos Júnior (Examinador externo)
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Laís Roberta Galdino de Oliveira (Examinadora externa)
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Alessandra Lee Barbosa Firmo (Examinadora externo)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco

Prof. Dr. Jorge Vinícius Fernandes Lima Cavalcanti (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico este trabalho ao meu avô,
Manuel Balbino de Barros (in memorian),
referência pessoal e profissional para o
meu desenvolvimento e evolução como
cidadão de bem.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Inteligência Suprema do Universo, por me conceder a oportunidade de realizar esta pesquisa, bem como o desenvolvimento e evolução profissional e pessoal;

À Virgem Imaculada, pela luz, bênçãos e benevolência, que, nos momentos críticos de realização deste trabalho, mostrou-me oportunidades para solucionar as inúmeras problemáticas;

Aos meus avós, Manuel Balbino de Barros (*in memorian*) e Maria Edwiges Magalhães de Barros (*in memorian*), fontes de grande inspiração para seguir na seara do desenvolvimento científico e tecnológico;

Aos meus pais, Paulo da Cruz Holanda (*in memorian*) e Vera Lúcia de Barros Holanda (*in memorian*), pela íntegra e completa formação educacional que recebi, na qual priorizaram a formação de um “cidadão de bem”;

Às minhas irmãs, Arthemis e Ana Paula de Barros Holanda, pelo carinho, amor, compreensão, companheirismo, paciência, força, e apoio etc.; aos meus tios Magda Lúcia, Alfredo Magalhães, João Magalhães, Nísia Barros, Maria das Graças Magalhães;

Aos meus orientadores, professores José Fernando Jucá e Leonor Alves, que, com muita paciência, carinho, consideração e benevolência, ajudaram-me no desenvolvimento deste trabalho;

Ao grande amigo, parceiro, “padrasto”, conselheiro, orientador e professor, o Engº. Antônio Rodrigues de Brito, pela riqueza de conhecimentos transmitidos acerca de todas as áreas do saber científico;

Aos amigos do Grupo de Resíduos Sólidos da UFPE, em especial, Daniela Santos, Liliana Santos, Derovil Santos, Rafaella Moura, Alice Albuquerque, Fellipe Brandão etc.;

Aos amigos do Laboratório de Solos e Instrumentação da UFPE, principalmente ao técnico Gutemberg Francisco, por toda parceria, apoio e orientações;

Aos amigos do Grupo de Processos e Tecnologias Ambientais (GPTA) da UFPE, em especial ao professor Maurício Motta, e as alunas Maryne Patrícia, Bruna Nascimento, Ziani Santana, por todo carinho e ajuda na realização das análises do substrato e digestato;

Ao pessoal da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFPE, Andréa Negromonte, Claudiana Pereira e Juliana Henriques, meus mais calorosos agradecimentos;

À professora Sávia Gavazza, pelo carinho e amizade de sempre;

A todos os funcionários da Autarquia de Manutenção e Limpeza Urbana do Recife – Emlurb, que atuam no aterro de resíduos sólidos da Muribeca, em especial Gilvan (Alemão), Washington, Oliab, Carlinhos, Paulo Padilha, por todo apoio e força para a finalização da tese;

À Finep, através do convênio FINEP nº 01.13.0092.00, por todo o auxílio no desenvolvimento da pesquisa;

À CAPES, pela concessão da bolsa de auxílio à pesquisa de Doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização da pesquisa.

RESUMO

A população mundial produz, anualmente, em torno de 2,01 bilhões de toneladas de resíduos sólidos urbanos (RSU). Destes, 924,6 milhões de toneladas referem-se aos resíduos orgânicos (RO), potenciais poluentes do solo, ar e água. A Digestão Anaeróbia (D.A.) destaca-se por: baixa emissão de gases de efeito estufa, capacidade de tratar resíduos sólidos e efluentes líquidos, e, sobretudo, pela geração do biogás e do biofertilizante. Em suma, a Digestão Anaeróbia se baseia na síntese de polímeros a oligômeros e monômeros, em ambiente anóxico. Constitui-se em quatro etapas: a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese, sendo, a hidrolítica, a fase limitante e mais complexa do processo. Visando acelerar a fermentação anaeróbia e o tempo de detenção hidráulica, adotou-se, nesta pesquisa, a técnica da bioaugmentação. Para tanto, um consórcio microbiano composto pelas cepas *Bacillus subtilis* (T9) e *Alcaligenes faecalis* (T19) foi utilizado, a fim de melhorar a fermentação de resíduos sólidos e líquidos e a produção de biogás e metano. Onze biodigestores BMP foram utilizados, inserindo-se neles quantidades variadas de substrato e inóculos. Adotou-se a ferramenta do Planejamento Experimental (DCCR – 2³, com curvatura) para elaborar as combinações, refletindo na redução do número de experimentos (onze biodigestores), com replicação nos pontos centrais. Compostos predominantemente por frutas (89,71%), com quantidades traços de folhosos (6,75%) e de leguminosas (3,54%), os resíduos orgânicos estudados apresentaram valores de umidade, pH, relação $\text{DBO}_5/\text{DQO}^{-1}$, sólidos voláteis de $0,93 \text{ g}^*\text{gST}^{-1}$ e relação C/N, de 85,56%, 3,5, 0,936, $0,93\text{g}^*\text{gST}^{-1}$, 12,3, respectivamente. Tais dados apontam para um resíduo ácido e biodegradável, apesar da relação C/N não ser favorável à fermentação anaeróbia. Autodepurado, o digestato melhorou os parâmetros de pH, DBO_5/DQO e SV. Após o ensaio BMP, observou-se o maior Potencial Acumulado de Biogás no Experimento 1 (3,0g RO+7,27mLDG+42,73mLC), registrando 113,26 NmL/gSV, seguido pelo Experimento 5 (2,5g RO+25mLDG+25mLC), registrando 53,13 NmL/gSV. Quanto aos Potenciais de gás metano presentes no biogás, tais Experimentos 1 e 5 atingiram, respectivamente, 62,57 e 37,76 $\text{NmL}_{\text{CH}_4}/\text{gSV}$, sendo, também, os Experimentos que obtiveram melhores rendimentos de metano. A bioaugmentação pode ajudar a D.A. de R.O. elevando a sua eficiência.

Palavras-chave: biomassa; energia renovável; fermentação anaeróbia; bioenergia; consórcio microbianos; energia verde.

ABSTRACT

The world population annually produces around 2.01 billion tons of urban solid waste (MSW). Of these, 924.6 million tons refer to organic waste (OR), potential soil, air, and water pollutants. Anaerobic Digestion (A.D.) stands out for: low emission of greenhouse gases, ability to treat solid waste and liquid effluents, and, above all, for the generation of biogas and biofertilizer. In short, Anaerobic Digestion is based on the synthesis of polymers to oligomers and monomers, in an anoxic environment. It consists of four steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis, with the hydrolytic being the limiting and most complex phase of the process. To accelerate the anaerobic fermentation and the hydraulic detention time, the bioaugmentation technique was adopted in this research. For this purpose, a microbial consortium composed of *Bacillus subtilis* (T9) and *Alcaligenes faecalis* (T19) strains was used to improve the fermentation of solid and liquid waste and the production of biogas and methane. Eleven BMP digesters were used, inserting in them varying amounts of substrate and inoculum. The Experimental Planning tool (DCCR – 2^3 , with curvature) was adopted to elaborate the combinations, resulting in a reduction in the number of experiments (eleven biodigesters), with replication at the central points. Composed predominantly of fruits (89.71%), with trace amounts of leafy vegetables (6.75%) and legumes (3.54%), the organic residues studied showed values of humidity, pH, $BOD_5 \cdot COD^{-1}$, volatile solids of 0.93 g $\cdot$ gST $^{-1}$ and C $\cdot$ N $^{-1}$ ratio of 85.56%, 3.5, 0.936, 0.93g $\cdot$ gST $^{-1}$, 12.3, respectively. Such data point to an acidic and biodegradable residue, despite the C/N ratio not being favorable to anaerobic fermentation. Self-depurated, the digestate improved the parameters of pH, $BOD_5 \cdot COD^{-1}$ and SV. After the BMP assay, the highest Accumulated Biogas Potential was observed in Experiment 1 (3.0g RO+7.27mLDG+42.73mLC), registering 113.26 NmL/gSV, followed by Experiment 5 (2.5g RO+ 25mLDG+25mLC), registering 53.13 NmL/gSV. As for the Potentials of methane gas present in the biogas, such Experiments 1 and 5 reached, respectively, 62.57 and 37.76 NmLCH $_4$ /gSV, being also the Experiments that obtained the best methane yields. Bioaugmentation can help A.D from O.R. increasing its efficiency.

Keywords: biomass; renewable energy; anaerobic fermentation; bioenergy; microbial consortium; green energy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gráfico apresentando o comportamento das nações na produção de resíduos per capita em função da renda per capita.	22
Figura 2 –	Mapa-múndi apresentando a geração anual per capita de RSU.	23
Figura 3 -	Diagrama do processo de digestão anaeróbia, exibindo as etapas da fermentação.	30
Figura 4 -	Procedimento metodológico experimental da pesquisa	49
Figura 5 -	Identificação geográfica do local de coleta dos resíduos hortifrutigranjeiros, nos âmbitos: a) Estadual; b) Regional; e c) Municipal	50
Figura 6 -	(a) Coleta; (b) Quarteamento; (c) Composição gravimétrica dos resíduos orgânicos hortifrutigranjeiros.	51
Figura 7 -	(a) Coleta e armazenamento de 10 litros de digestato em bombonas; (b) Envolvimento das bombonas com o digestato em sacos plásticos pretos.	54
Figura 8 –	Resultados dos parâmetros físico-químicos do digestato: (a) e (b) Demanda bioquímica e química de oxigênio; (c) Potencial hidrogeniônico; (d) razão biodegradação referente ao inóculo; e (e) Percentual de sólidos voláteis presentes no efluente.	55
Figura 9 –	Transferência dos discos do consórcio microbiano desenvolvidos nas placas de Petri para Erlenmeyers contendo meio líquido BHI. Na sequência, incubação em estufa, à T = 37°C por 24h.	57
Figura 10 -	Biorreator, composto em borossilicato (garrafa), nylon (tampa) e latão (conexões), utilizado no ensaio BMP.	60
Figura 11 –	Procedimento de montagem do ensaio BMP: (a) pesagem do substrato; (b) quantificação do volume de consórcio microbiano; (c) incubação e monitoramento dos biorreatores em estufa.	62
Figura 12 –	Quantificação percentual de resíduos hortifrutigranjeiros utilizados como substrato.	66
Figura 13 –	a) Valores iniciais (pré-biodigestão) e finais (pós-biodigestão) do pH dos experimentos; b e c) Redução dos teores de sólidos voláteis dos experimentos.	72

Figura 14 – a) Volumes de Biogás Acumulados e b) Taxas de Geração referentes aos experimentos 9, 10 e 11 (ponto central).	74
Figura 15 – Volume Acumulado de Biogás dos experimentos 8, 9, 10 e 11, sendo os três últimos a triplicata no ponto central.	75
Figura 16 – Volume Acumulado de Biogás entre os Experimentos 7, 8 e a média da triplicata no ponto central (9, 10 e 11).	77
Figura 17 – Desempenho da Geração Acumulada de Biogás dos Experimentos 5, 6 e a média da triplicata no ponto central (Experimentos 9, 10, 11).	78
Figura 18 – O desempenho da Geração Acumulada de Biogás entre os Experimentos 1, 2 e 9.	82
Figura 19 – a) Volume Acumulado e b) Taxa de Geração de Biogás dos Experimentos 5, 6 e a média das triplicatas.	83
Figura 20 – Potencial Acumulado de Biogás e Metano provenientes do Experimento 1.	85
Figura 21 – Desempenho do Potencial de Biogás e Metano referente ao Experimento 2.	86
Figura 22 – Desempenho do Potencial de Biogás e metano referente ao Experimento 4.	87
Figura 23 – Desempenho do Potencial de Biogás e Metano do Experimento 5.	88
Figura 24 – Desempenho dos Potenciais de Biogás e Metano do Experimento 8.	89
Figura 25 – Desempenho dos Potenciais de Biogás e Metano do Experimento 9.	90
Figura 26 – A variação do pH como fator resultante da relação entre substrato / inóculo.	91
Figura 27 – Variação do percentual de redução do teor de sólidos voláteis nos Experimentos analisados.	92
Figura 28 – Potencial acumulado de biogás em função da relação substrato / inóculo.	93
Figura 29 – (a) Gráfico referente ao percentual de metano produzido nos Experimentos realizados, (b) Experimentos que se destacaram no percentual de geração de metano.	94

Figura 30 – Gráficos de superfície de resposta (DCCR) acerca dos teores de metano em relação a: a) headspace (%); b) temperatura (°C); c) headspace (%) em função da temperatura (°C). 95

Figura 31 - Comportamento do potencial de geração de metano dos experimentos estudados. 96

SIMBOLOGIAS

Φ –	Diâmetro
T –	Temperatura
t –	Tempo
pH –	Potencial hidrogeniônico
1:100 –	um mililitro para cada 100 mililitro
λ –	Comprimento de onda eletromagnética
N –	Concentração normal
DBO –	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO –	Demanda Química de Oxigênio
DG –	Digestato
GPTA –	Grupo de Processos e Tecnologias Ambientais
ST –	Sólidos totais
SV –	Sólidos voláteis
SF –	Sólidos fixos
C (ou CM) –	Consórcio microbiano
BHI –	<i>Brain Heart Infusion</i> – Infusão cérebro / coração
RO –	Resíduo orgânico
DCCR –	Delineamento Composto Central Rotacional
BMP –	<i>Biochemical Methane Potential</i> – Potencial Bioquímico do Metano
kgf/cm ² –	Quilograma-força por centímetro quadrado
Q –	Vazão
L/h –	Litro por hora
Δp –	Variação de pressão
INMET –	Instituto Nacional de Meteorologia
V ₁ –	Volume final
V ₀ –	Volume inicial
V _(headspace) –	Volume do <i>headspace</i>
CNTP –	Condições normais de temperatura e pressão

UNIDADES DE MEDIDA (S.I.)

L –	Litro
kg –	Quilograma
mL –	Mililitro
mm –	Milímetro
nm –	Nanômetro
g –	Grama
mg -	Miligrama
°C –	Grau Celsius
°K –	Grau Kelvin
kPa –	quiloPascal
atm –	Atmosfera
h –	Hora

ABREVIATURAS

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – Dicromato de potássio

NaOH – Hidróxido de sódio

N_2 – Nitrogênio

CO_2 – Dióxido de carbono

CH_4 – Gás metano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral	19
2.2	Específicos	19
2.3	Justificativa da Tese	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Resíduos Orgânicos	24
3.2	Tecnologia da Digestão Anaeróbia	27
3.2.1	Fatores que influenciam na Digestão Anaeróbia	32
3.2.2	O uso de um digestato de biodigestor anaeróbio como um potencial agente alcalinizante	38
3.3	A Biotecnologia aplicada à Digestão Anaeróbia	40
3.3.1	A cepa <i>Bacillus subtilis</i>	43
3.3.2	A cepa <i>Alcaligenes faecalis</i>	46
3.4	O Potencial Bioquímico do Metano de biomassas	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.2	Coleta e composição gravimétrica do substrato (resíduos orgânicos hortifrutigranjeiros) (RO)	49
4.2.1	Determinações de parâmetros físico-químicos (Umidade, pH, Demandas Química e Bioquímica de Oxigênio, Sólidos Voláteis)	52
4.3	Coleta, Análises físico-químicas e Autodepuração do Digestato (DG)	54
4.4.	Reativação do Consórcio Microbiano facultativo (C)	56
4.5.	Delineamento Composto Central Rotacional DCCR – Planejamento Fatorial Experimental Composto Central, com triplicata no ponto central	57
4.6.	Montagem e realização do Ensaio do Potencial Bioquímico do Metano (<i>Biochemical Methane Potential</i>)	59
4.6.1	Monitoramento diário e Tratamento dos dados obtidos no ensaio BMP.....	62
4.6.2	Método e procedimento de análise quantitativa do biogás produzido.	64

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	Resíduos hortifrutigranjeiros	66
5.1.1	Composição dos resíduos hortifrutigranjeiros	66
5.1.2	Análises físico-químicas dos resíduos	67
5.2	Uso do digestato oriundo de biodigestor anaeróbio como potencial inóculo	68
5.3	Determinação do Potencial hidrogeniônico e de sólidos voláteis dos biodigestores BMP	71
5.4	Geração Acumulada e Taxa de Geração de Biogás dos biodigestores BMP	73
5.5	Produção de Acumulada de Biogás em função da variação da quantidade de substrato	78
5.6	Potencial Bioquímico do Metano oriundo dos biodigestores BMP	84
5.7	Metodologia da Superfície de Resposta para determinação de condições ótimas para a biodigestão anaeróbia	90
5.8	Análise cinética do processo biodegradativo anaeróbio e a geração de metano dos experimentos realizados	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
6	SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS	101
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

Considerado um dos pilares do Saneamento Ambiental, a Gestão de Resíduos Sólidos tem surgido como uma das grandes problemáticas do mundo contemporâneo (SUKPHUN *et al.*, 2021). Visando ao tratamento de resíduos sólidos biodegradáveis, a tecnologia da Digestão Anaeróbia consiste na quebra de substâncias orgânicas complexas (polímeros de alto peso molecular) produzindo oligômeros e monômeros, na ausência de oxigênio livre. Como produtos da sequência deste processo, são obtidos o biogás, composto gasoso rico em metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) e o biofertilizante, composto líquido rico em nutrientes (RABII *et al.*, 2019). A atividade fermentativa anaeróbia é composta por quatro fases bem definidas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (SUKPHUN *et al.*, 2021). Dentre estas, a fase hidrolítica consiste na fase limitante do processo biodegradativo (uma vez que é a mais lenta), visto que, nesta, é degradada, em massa, a matéria orgânica complexa (carboidratos, proteínas e lipídeos), caracterizada pela elevada carga orgânica, e alta produção de ácidos graxos, causando a queda do pH do sistema (MENZEL *et al.*, 2020).

Inúmeros autores, como Kasinath *et al.* (2021), Tyagi *et al.* (2021), González *et al.* (2022), Obaideen *et al.* (2022), relatam a necessidade de realização de um tratamento prévio à fermentação anaeróbia como potencial solução à degradação de substratos complexos (resistentes), tornando-se um sistema de duplo estágio (MALINOWSKY, 2021; LE *et al.*, 2022). Este tratamento prévio, no entanto, pode gerar um aumento de 20-40% no custo total do processo (ANUKAN *et al.*, 2019; MENZEL *et al.*, 2020). Preponderante, este fator é determinante para a baixa utilização do pré-tratamento em plantas de tratamento de resíduos e geração de biogás.

O tratamento biológico de resíduos orgânicos, com auxílio da bioaugmentação, pode oferecer uma solução à problemática em questão. Todavia, um conhecimento detalhado acerca dos organismos existentes nos consórcios de microrganismos é de suma importância, uma vez que determinará o desempenho e as respostas das cepas aos condicionantes ambientais (STRANGE *et al.*, 2017; BHATIA *et al.*, 2018; LEBIOCKA *et al.*, 2018).

A técnica da bioaugmentação é definida como a adição de biomassas microbianas (bactérias, fungos, bem como enzimas secretadas) a áreas contaminadas, visando a enriquecer e a fortalecer a população microbiana originária, atuante no ambiente degradado, no intuito de melhorar a eficiência de remoção de poluentes, assim como reduzir o tempo e os custos de remoção (AHMAD *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2022).

Neste sentido, a biotecnologia, através da técnica da bioaugmentação (a qual consiste na adição, a um processo biológico, de microrganismos oriundos de culturas microbianas especializadas, desenvolvidas previamente sob condições bem definidas), aparece, estrategicamente, com a finalidade de atuar, fundamentalmente, na fase hidrolítica, a fim de mitigar os efeitos adversos que caracterizam esta fase, permitindo o livre desenvolvimento da digestão anaeróbia (LEBIOCKA *et al.*, 2018).

Conforme verificado e mencionado por diversos autores, entre eles Alina *et al.* (2015), Bhatia *et al.* (2018), Ahmed *et al.* (2019), Jawed *et al.* (2019), McCarty & Ledesma-Amaro (2019), Cifuentes & Öztürk *et al.* (2020), Danilova & Sharipova (2020), Su *et al.* (2020), a bioaugmentação tem sido aplicada de forma crescente, intensivamente, nos mais variados sistemas biológicos presentes nos setores primário, secundário e terciário da economia mundial.

Observa-se, notoriamente, que a Engenharia Microbiológica Experimental aplicada à Gestão de Resíduos Sólidos vem se consolidando como um instrumento crucial para a bioprospecção de microrganismos e estabelecimento de associações entre cepas, com o fim de otimizar a degradação anaeróbia e a geração de biogás e metano de resíduos sólidos orgânicos (LEBUHN *et al.*, 2014; EDWIGES *et al.*, 2018; RAM *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

O presente capítulo apresenta os objetivos alcançados com as atividades realizadas no desenvolvimento da referida pesquisa.

2.1. Geral

Otimizar a etapa hidrolítica da degradação anaeróbia de resíduos hortifrutigranjeiros, aplicando-se um consórcio microbiano formado pelas cepas *Alcaligenes faecalis* e *Bacillus subtilis*, avaliando sua influência na produção de biogás e biometano através do ensaio BMP (*Biochemical Methane Potential*).

2.2. Específicos

- Determinar a composição gravimétrica dos resíduos orgânicos hortifrutigranjeiros;
- Incubar/aclimatar, à temperatura ambiente o digestato, proveniente da planta de biogás da Ceasa, objetivando corrigir o pH e a carga orgânica (DBO, DQO e SV);
- Tornar o digestato um potencial agente tamponante, através do processo de autodepuração do próprio efluente presente na bombona, no qual ocorre a decomposição de substâncias, reduzindo a carga orgânica e elevando o pH do sistema;
- Reativar, utilizando, para o desenvolvimento, meio ágar nutritivo, sob temperatura controlada (37°C), um consórcio (C) de microrganismos hidrolíticos facultativos, composto pelas cepas *Alcaligenes faecalis* e *Bacillus subtilis*;
- Determinação de análises físico-químicas nos Experimentos, antes e após a realização do ensaio BMP;
- Quantificar as produções de biogás e metano do ensaio BMP realizado em todos os experimentos realizados;
- Verificar, através das análises físico-químicas (pH, DBO, DQO, SV, C/N, BMP), se o substrato utilizado favorece ou não a digestão anaeróbia;
- Avaliar o efeito da inserção do consórcio na taxa de degradação e produção de biogás nos biodigestores, através do monitoramento da pressão do sistema BMP;

- Determinar, quantitativamente, os gases metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂);

2.3. Justificativa da Tese

A disposição final de resíduos sólidos urbanos se constitui em uma das principais formas de emissões antrópicas de gases de efeito estufa, devido à contínua geração e emissão de biogás e metano para a atmosfera. Além disso, as colossais quantidades de biomassas residuais produzidas, em âmbito mundial, dispostas inadequadamente, nos lixões, são responsáveis pela contaminação da atmosfera, dos solos e dos corpos d'água superficiais e subterrâneos, representando um passivo ambiental de grandes proporções, depreciando a qualidade ambiental e comprometendo a saúde pública (GÓMES-SANABRIA *et al.*, 2022).

A Digestão Anaeróbia consiste em uma das alternativas tecnológicas de tratamento de resíduos sólidos urbanos mais difundidas mundialmente, nos últimos anos (PADILHA e MESQUITA, 2022). Composta pelas etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, a Digestão Anaeróbia apresenta, nas duas primeiras etapas, as fases limitantes do processo, nas quais ocorre a síntese de extensos e complexos polímeros a oligômeros e monômeros simples, de baixos pesos moleculares, provocando alterações no pH, carga orgânica etc. O mau controle operacional de um processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos pode provocar o colapso da fermentação, visto que pode ocorrer o acúmulo de substâncias e gases tóxicos à microbiologia da digestão (HOSSAIN *et al.*, 2022).

Com o objetivo de proporcionar maior eficiência e celeridade na conversão e na simplificação de substâncias complexas, a aplicação de consórcios de microrganismos à fermentação anaeróbia de biomassas tem sido apontada como uma importante estratégia para se obter bons quantitativos em termos de biogás e biometano produzidos.

Desta forma, surgem os seguintes questionamentos:

- A técnica da bioaugmentação é capaz de proporcionar benefícios à digestão anaeróbia?

- É capaz de suportar e vencer a hostilidade dos fatores inibidores da fermentação anaeróbia (alta carga orgânica, baixo pH, alto teor de amônia etc.)?

Apresentando como características biológicas a capacidade de suporte a variações de parâmetros ambientais, como pH, carga orgânica e temperatura, os consórcios de microrganismos atuantes nas primeiras etapas da fermentação anaeróbia constituem-se elementos-chave, na otimização da cinética de conversão de substratos, refletindo imediatamente na taxa de produção de compostos gasosos (WILTSCHI *et al.*, 2020). Ou seja, esta estratégia pode significar uma importante alternativa para problemas de sobrecarga orgânica em digestores anaeróbios, abrindo-se, desta forma, um leque de opções de tratamento anaeróbios de biomassas residuais (KABAIVANOVA *et al.*, 2022).

O conhecimento das características biológicas dos consórcios microbianos são fundamentais para analisar a capacidade destes agentes em atuar na fase hidrolítica da fermentação anaeróbia. Uma vez que a hidrólise consiste na fase de maior limitação do processo de digestão anaeróbia, segundo Menzel *et al.* (2020), a aplicação da bioaugmentação contribui para intensificar a taxa de biodegradação, e, portanto, proporcionar celeridade à hidrólise.

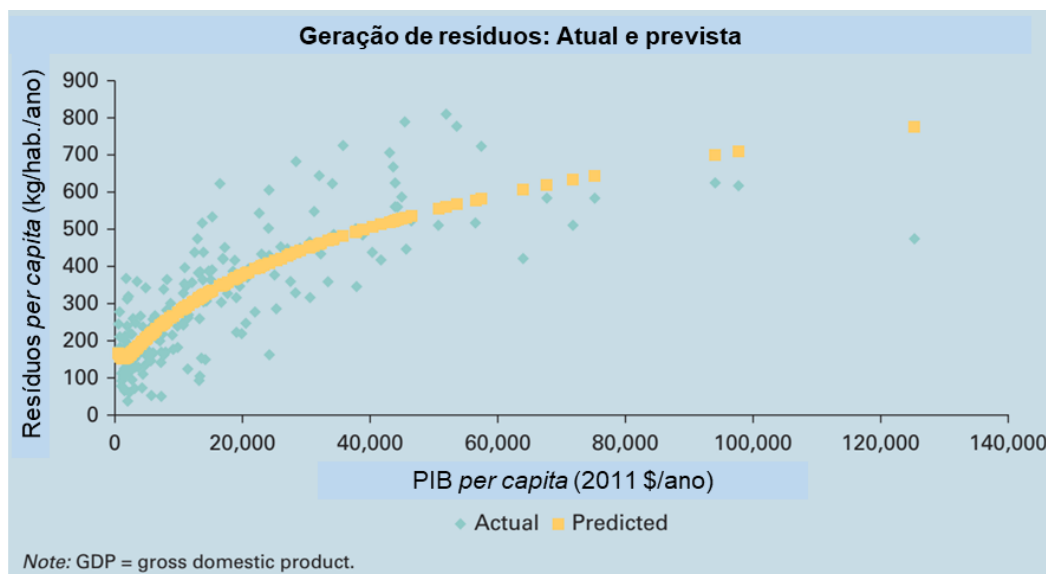
Wojcieszak *et al.* (2017) e Edwiges *et al.* (2018) salientam que o consórcio de microrganismos hidrolíticos adaptados a esta fase específica da fermentação anaeróbia favorecem fortemente a digestão anaeróbia.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os resíduos sólidos urbanos consistem em materiais resultantes de atividades antrópicas, considerados inservíveis e/ou inúteis, originários de ambientes domésticos, logradouros públicos (serviços de varrição, capinação e poda de vegetações), bem como de atividades de comércio em geral (SINIR e ABRELPE, 2020).

Podendo se tornar um agente contaminante do ambiente, se disposto sem o emprego de normas de tratamento adequadas, os resíduos sólidos urbanos são gerados de acordo com o nível de renda (capacidade de produzir bens e serviços) dos habitantes de uma nação, e variam em função dos aspectos socioeconômicos referentes a cada economia, conforme é possível constatar na Figura 1 (KUMAR *et al.*, 2017; ABDEL-SHAIFY & MANSOUR, 2018; KUMAR *et al.*, 2020).

Figura 1 - Gráfico apresentando o comportamento das nações na produção de resíduos per capita em função da renda per capita.



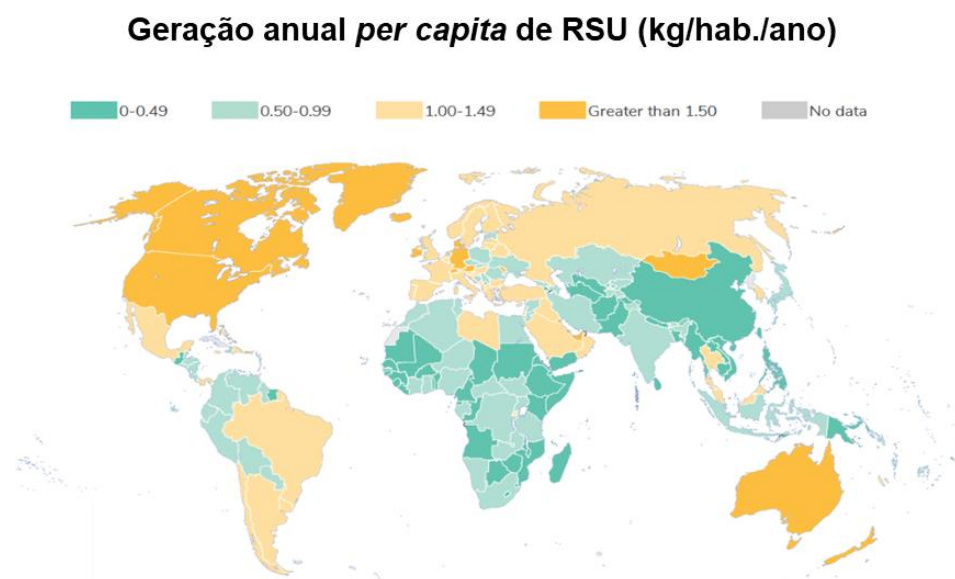
Fonte: Adaptado de World Bank (2018)

Através da Figura 1, observa-se:

- que atualmente, a maioria dos países apresenta Produto Interno Bruto *per capita* entre U\$\$ 0 - 20.000/hab./ano e geração de resíduos *per capita* de 80 – 300 kg/hab./ano;
- Os habitantes da maioria dos países possuem renda de U\$\$ 1.670/hab./mês e geram um quantitativo de 6,7 – 25 kg/hab./mês;

- Verifica-se, também, uma relação diretamente proporcional entre PIB *per capita* e geração de RSU *per capita*, pois, à medida que aumenta o nível de renda/poder de compra da população, ocorre um aumento imediato no consumismo e aquisição de bens e serviços;
- Não obstante essas observações, são identificados alguns registros de nações que apresentam elevados níveis de renda, com produção de resíduos relativamente baixa. Isso, possivelmente, se deve à implantação e estabelecimento de políticas ambientais e socioeconômicas na Educação básica, técnico-profissionalizante e superior, que reflete em uma sociedade com acesso a mecanismos de desenvolvimento, reduzindo, consideravelmente, o desperdício de materiais.

Figura 2 – Mapa-múndi apresentando a geração anual per capita de RSU.



Fonte: Adaptado de World Bank (2018)

Analisando a Figura 2, depreende-se que:

- Observa-se que, de maneira geral, os países que possuem baixas rendas *per capita* (\$/hab./dia) apresentam baixos volumes de RSU gerados (\$/hab./dia). Isto pode ser explicado pela falta de Políticas Públicas, bem como pela inacessibilidade ou precariedade de acesso aos serviços públicos básicos;

- Por outro lado, as nações que possuem elevada renda *per capita* tendem a apresentar alta geração de resíduos, sobretudo devido ao elevado poder de compra de bens e serviços de seus habitantes;
- É constatado, ainda, que, em parte dos países desenvolvidos, há Políticas Públicas bem arraigadas e implementadas na sociedade, o que contribui para um comportamento embasado no consumo consciente e redução de desperdício.

3.1 Resíduos Orgânicos

Correspondendo a uma parcela de, aproximadamente, 45% dentro de um montante de 80 milhões de toneladas de resíduos gerados no Brasil, os resíduos orgânicos apresentam alta capacidade de reciclabilidade (SINIR, ABRELPE, 2020).

Constituindo-se no principal componente dos resíduos sólidos urbanos, a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos consiste na fração biodegradável do montante de resíduos, compreendendo resíduos de alimentos, de cozinha, jardinagem, dos quais os resíduos alimentares ocupam a maior parte (PARITOSH *et al.*, 2018; CASALLAS-OJEDA *et al.*, 2020; CHOW *et al.*, 2020; EPA, 2022).

Tomando-se como embasamento que os resíduos orgânicos são responsáveis, majoritariamente, pelos maiores números percentuais dentro da composição dos resíduos sólidos urbanos, torna-se fundamental empregar maior atenção a esta tipologia de resíduos, uma vez que as várias tecnologias existentes para o seu tratamento têm diversas vantagens, além do fato de que os produtos destas tecnologias possuem elevados valores agregados (ABDEL-SHAFFY & MANSOUR, 2018; POUR e MAKKAWI, 2021).

Os resíduos alimentares são compostos por altos níveis de substratos orgânicos, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos, os quais fazem dele uma ideal fonte de recursos renováveis. As indústrias de alimentos consistem nos principais agentes produtores deste tipo de resíduo, uma vez que os produzem em grandiosas quantidades, sobretudo a hotéis e restaurantes (BENICHE *et al.*, 2020; POUR e MAKKAWI, 2021).

Características como o elevado teor de umidade (>70%), o elevado teor de sólidos voláteis (>85%) a alta proporção entre frutas e vegetais, favorecem a rápida decomposição natural dos materiais em um curto período (BENICHE *et al.*, 2020; POUR e MAKKAWI, 2021).

Diante disso, supõe-se que tal substrato é indicado para a fermentação anaeróbia dos resíduos. Porém, é fundamental acautelar-se de que diversos fatores são importantes para a ocorrência do pleno desenvolvimento do processo bioquímico, a fim de evitar o colapso do sistema (SILLERO *et al.*, 2022).

Os centros de abastecimentos de produtos hortifrutigranjeiros e da indústria de proteínas animais produzem, diariamente, uma grande quantidade de resíduos orgânicos que possuem um alto potencial de tratabilidade através de tecnologias biológicas.

O Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (Ceasa-PE) possui mais de 1.600 permissionários, comercializando, mensalmente, um montante superior a R\$ 190 milhões e gerando em torno de 40.000 empregos diretos e indiretos. Encontra-se instalado em uma área total de 580.000 m² (ARPE, 2016; SILVA, 2018).

Em funcionamento desde o início dos anos 1970, este centro comercializa, mensalmente, cerca de 80.000 toneladas de produtos por mês, gerando uma quantidade média mensal de 1.200 toneladas de resíduos (ARPE, 2016; SILVA, 2018). Deste montante, 90% são classificados como orgânicos, ou seja, 1.080 toneladas referentes a materiais orgânicos.

Ao estudar o tratamento biológico anaeróbio de resíduos sólidos oriundos de centrais de abastecimento e feiras livre em reator anaeróbio de batelada, Leite *et al.* (2003) utilizaram como inóculo lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgotos para a realização da pesquisa. Para tanto, necessitou-se conhecer o percentual de umidade presente nos resíduos sólidos vegetais (RSV) e no lodo de esgoto sanitário (LES). Assim, foi determinado que a constituição da mistura substrato/inóculo seria de 80% de RSV e 20% de LES (percentagem em peso). Foi aplicada uma carga orgânica de 600 kg_{substrato}*m⁻³ reator.

Neste estudo, o reator, com capacidade de 2.200 L, recebeu massas de 1.057,6 kg de RSV e 264,4 kg de LES, totalizando 1.322 kg, operando durante um tempo de detenção hidráulica de 270 dias. Ao término da fermentação anaeróbia, a produção de biogás atingiu um volume total e um potencial de 1.200 L e 42,19 L de biogás*kg SV⁻¹ (Leite *et al.*, 2003).

Constituindo-se um centro de abastecimento de grande porte no Sudeste do Brasil, a CEASAMinas localizada em Uberlândia-MG, contém cerca de 2.000 clientes diretos e mais de 3,5 milhões de clientes indiretos, com 144 empresas estabelecidas e 358 produtores rurais ativos (RAMOS, 2017). Ramos (2017), realizou um estudo gravimétrico no qual visou conhecer a composição dos resíduos sólidos oriundos da CEASAMinas, de Uberlândia.

De um montante amostrado de 550 kg de resíduos sólidos, verificou-se que o quantitativo de orgânicos foi de 422,16 kg (ou 77%), sendo os 23% restantes representados pelas demais tipologias (RAMOS, 2017).

Em estudo gravimétrico realizado na Ceasa-GO, localizada em Goiânia-GO, Costa (2021) elencou subtipologias de resíduos orgânicos, tais como: “folhas”, “legumes”, “citrus”, “frutas”, “coco + guariroba”, e “outros orgânicos”. Executado em duas etapas – a primeira em Agosto/2020, e a segunda em Setembro/2020 -, verificou-se a presença de 63% de resíduos orgânicos, na primeira análise, ante 24% de orgânicos, na segunda. Totalizando um universo amostral de resíduos orgânicos de 13.691,38 kg, tais centrais de abastecimento reúnem milhares de estabelecimentos geradores de resíduos.

Pôde-se apresentar, supracitadamente, exemplos de estudos que expuseram algumas centrais de abastecimento de produtos hortifrutigranjeiros como fontes geradoras de resíduos orgânicos, constituindo-se em potenciais estabelecimento com competência (capacidade) para receber investimentos massivos, no tocante à instalação e aplicação de tecnologias de transformação de resíduos orgânicos em energia renovável e combustíveis verdes (COSTA, 2021).

É válido salientar, também, a particularidade dos resíduos hortifrutigranjeiros, no que tange à sua constituição tipológica, visto que eles se diferenciam fortemente dos resíduos sólidos urbanos, pois são provenientes,

sobretudo, de atividades do setor primário da economia – o qual abrange a agricultura, a pecuária, a piscicultura etc. – cuja tipologia de orgânicos pode atingir percentuais superiores a 60% (LEITE *et al.*, 2003).

Por sua vez, os resíduos sólidos urbanos, caracterizados pelos materiais gerados nos centros urbanos, apresentam uma grande diversidade de tipologias de resíduos, exigindo uma etapa prévia de triagem, a fim de separar os inorgânicos e potencializar a presença dos orgânicos, para fins de aplicação em tecnologias de fermentação biológica (ZHANG *et al.*, 2022).

Leitão e Barcellos (2021) evidenciam que, em âmbito mundial, em torno de um terço de todos os produtos de hortaliças sejam descartados em forma de perdas e desperdícios (YAHIA *et al.*, 2019). Tal montante de resíduos orgânicos pode atingir um quantitativo de $1,3 \times 10^9$ (1,3 bilhão) de toneladas por ano, uma vez que refletem diretamente no volume de substratos biodisponíveis para a fermentação biológica aeróbia e anaeróbia (FAO, 2019)

Corroborando tais dados, um estudo desenvolvido por Aguko *et al.* (2020), que realizaram a separação gravimétrica dos resíduos sólidos da cidade de Kibuye, Quênia. Informações de geração e descarte de resíduos urbanos mostraram que um percentual acima de 60% se constituiu de orgânicos, ante valores mínimos percentuais referentes às demais tipologias de resíduos.

É importante destacar que o Quênia se trata de um país onde mais da metade da população vive abaixo da linha da pobreza (país subdesenvolvido), a desnutrição é um fator avassalador, a qual expõe fortemente a precariedade dos serviços públicos básicos de saúde.

3.2. Tecnologia da Digestão Anaeróbia

Desenvolvida há mais de século, e aprimorada desde meados do século XX, a tecnologia da Digestão Anaeróbia tem se disseminado ao redor do mundo, sobretudo pela sua flexibilidade em relação aos insumos dos quais consegue fermentar, podendo também adaptar-se a variadas condições geográficas (LANSING *et al.*, 2008; ANUKAM *et al.*, 2019; AKINBOMI *et al.*, 2022).

Despontando como uma alternativa promissora visando a contribuir para a redução de emissões de gases de efeito estufa (GEEs), a Digestão Anaeróbia é

considerada uma viável e potencial tecnologia para tratamento no âmbito da Gestão de Resíduos Sólidos. Apresentando numerosas vantagens, esta tecnologia possui uma positiva taxa de produção de energia, cujo gás metano, principal gás proveniente da fermentação bioquímica anaeróbia, surge como elemento com grande capacidade para substituir o emprego dos combustíveis fósseis nas grandes economias mundiais (MEEGODA *et al.*, 2018; NÁTHIA-NEVES *et al.*, 2018; ZUPANCIC *et al.*, 2022).

Fundamentando-se como um processo bioquímico de fermentação e sintetização de biomassas, sob ambiente isento de oxigênio livre, a biodigestão anaeróbia é realizada pela atuação de conglomerados de microrganismos, que atuam em sinergia, sintetizando e reduzindo complexos compostos orgânicos (polímeros complexos, com elevadas cadeias carbônicas) a oligômeros e monômeros simples, produzindo, ao final do processo, dois subprodutos: o biogás, um composto gasoso rico em metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), e o digestato, ou digerido. Este último consiste em um efluente líquido ou semissólido, cuja principal característica é o seu elevado teor de nutrientes, possuindo utilidade como agente de recondicionamento de solos com alto nível de degradação (LE PERA *et al.*, 2021; VALECHA *et al.*, 2021).

Em sua operação, a Digestão Anaeróbia apresenta quatro fases bem definidas: a hidrólise, acidogênese, a acetogênese e a metanogênese (Figura 1).

A primeira fase, chamada de hidrólise (ou fase de solubilização), decompõe os constituintes de alto peso (carboidratos, proteínas e lipídeos) em materiais orgânicos menores solúveis, tais como ácidos graxos, glicose e aminoácidos, por exoenzimas. Os microrganismos atuantes nesta fase possuem capacidade de resistir a fortes variações de condicionantes ambientais, e a toxinas que possam estar presente nas biomassas (matérias-primas) (MEEGODA *et al.*, 2018; WEINRICH e NELLES, 2021).

Esta fase pode ocorrer em uma extensa amplitude de pH, porém o intervalo entre 6-8 é considerado como ótimo por diversos pesquisadores presentes na literatura (PHAN VAN *et al.*, 2019).

Por ser considerada a fase limitante da Digestão Anaeróbia, uma vez que é a fase em que ocorrem as mais complexas reações bioquímicas de simplificação

de material orgânico, a hidrólise tem sido o foco de inúmeras pesquisas de pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos (PHAN VAN *et al.*, 2019), visando à redução do tempo de detenção hidráulica (TDH) (WEINRICH e NELLES, 2021).

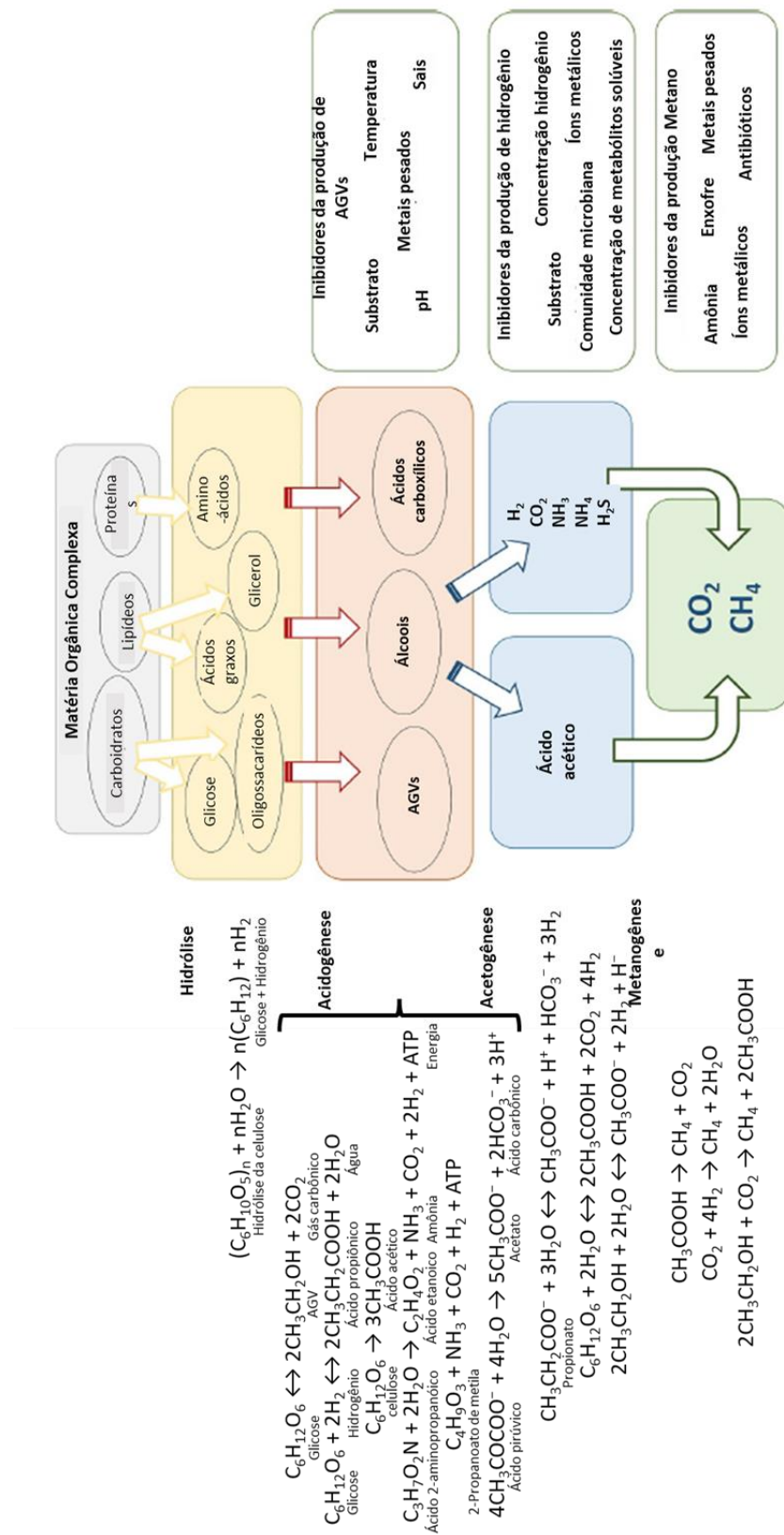
Posterior à fase hidrolítica, encontra-se a acidogênese, a qual é a segunda fase da fermentação anaeróbia, sendo caracterizada pela transformação dos produtos do processo hidrolítico em ácidos graxos voláteis (AGV), tais como ácidos propiônico, butírico, acético e etanol, através da ação de bactérias acidogênicas. Outras características são o rápido e o forte crescimento. As condições de pH influenciam significativamente os AGV produzidos. Os valores de pH, para esta fase, variam entre 4 e 8, onde os valores inferiores a 4 inibem fortemente a formação de AGV. Nesta fase, os valores ótimos de pH estão entre 5,5-6,5 (MAO *et al.*, 2015; PHAM VAN *et al.*, 2019; RAMOS-SUAREZ *et al.*, 2021).

Por sua vez, a acetogênese, que se constitui na terceira fase da Digestão Anaeróbia, transforma a maioria dos produtos da acidogênese em ácido acético (CH_3COOH), hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2) (PHAM VAN *et al.*, 2019). A cinética de crescimento da acetogênese é menor do que a da acidogênese. Sendo estritamente anaeróbias, a presença de oxidantes como oxigênio ou nitrato no meio é altamente tóxico às bactérias acetogênicas, que possuem como ambiente ótimo de atividade o ambiente fracamente acidificado, pH de 6,0-6,2 (PHAM VAN *et al.*, 2019; RAMOS-SUAREZ *et al.*, 2021).

Finalmente, a quarta e última fase da fermentação anaeróbia destaca-se por realizar o mais importante trabalho, que consiste na geração do gás metano pelas *Archeas* metanogênicas. Há dois mecanismos básicos para a geração de metano na metanogênese: i) a via acetotrófica (acetoclástica), as bactérias acetotróficas utilizam o ácido acético na produção do metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2); ii) a via hidrogenotrófica, que utiliza o dióxido de carbono (CO_2) e o hidrogênio (H_2) como fonte de nutrição (LIN *et al.*, 2018; PHAM VAN *et al.*, 2019; RAMOS-SUAREZ *et al.*, 2021).

Tal processo bioquímico pode ser mais bem visualizado e compreendido através do esquema descrito na Figura 1, na qual há presentes todos os agentes envolvidos na fermentação anaeróbia.

Figura 3 - Diagrama do processo de digestão anaeróbia, exibindo as etapas da fermentação.



Fonte: Adaptado de Harirchi et al. (2022)

As metanogênicas são extremamente sensíveis a condições de pH, presença de oxigênio livre, bem como outros fatores, tais como amônia livre (NH_3), gás sulfídrico (H_2S), e ácidos graxos voláteis (AGV). Não conseguem trabalhar sob condições de pH inferiores a 6,2, sendo letal ambientes com pH inferior a 6,0. Por outro lado, pode ser inibida pela liberação de amônia livre, quando o pH ambiente apresenta valores acima de 7,8. A literatura específica relata valores ótimos de pH entre 7,0-7,2 (MAO *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2018; PHAM VAN *et al.*, 2019; ERYILDIZ *et al.*, 2020).

A desestabilização do processo metanogênico ocorre quando os valores de nitrogênio amoniacal livre se encontram entre 0,60-0,69 g / L, reduz em 50%, quando atinge 1,45 g / L, e colapsa ao alcançar o intervalo entre 1,70 e 1,80 g / L (LIN *et al.*, 2018; MEEGODA *et al.*, 2018; PHAM VAN *et al.*, 2019; HARDY *et al.*, 2021).

No que diz respeito aos teores de enxofre e ácidos graxos voláteis (AGV), a literatura específica menciona que valores ótimos de enxofre, para o crescimento das metanogênicas, variam entre 16-160 mg S / L. Já em relação ao teor de ácidos graxos voláteis (AGV), foi verificado que, para que ocorresse uma estabilidade da metanogênese, as concentrações devam ser baixas (< 200 mg / L), e por outro lado, concentrações de acetato superiores a 3 g / L são letais aos referidos microrganismos (LIN *et al.*, 2018; PHAM VAN *et al.*, 2019).

Posterior ao detalhamento das fases do processo anaeróbio, a exposição de algumas de suas vantagens se faz necessária, uma vez que a grande popularização e adoção desta tecnologia pelos setores agrícola (primário) e industrial (secundário) das economias encontra-se intrinsecamente atrelada a elas, contribuindo, progressivamente, para a diversificação da matriz energética mundial (SEGURA-SALAZAR e TAVARES, 2018).

Anukan *et al.* (2019) elencam algumas vantagens do processo de digestão anaeróbia, dentre elas: i) a redução do desmatamento e de emissões de gases de efeito estufa; ii) uma técnica bioquímica de tratamento de dejetos humanos e animais; iii) uma fonte de produção de energia na forma de biogás, que pode ser usado como matéria-prima de gás liquefeito de petróleo (gás de cozinha); iv) efluentes do processo de digestão são ricos em nutrientes e podem ser usados

como fertilizantes agrícolas; v) contribui na melhoria da qualidade do ar; vi) menor quantidade de bio sólidos depositados, ou em deposição; vii) contribui consideravelmente para o desenvolvimento da região, melhorando a qualidade ambiental, e proporcionando uma variabilidade e aumento na geração de renda da população local (OBAIDEEN *et al.*, 2022).

Não obstante os benefícios obtidos com a adoção desta tecnologia, é de fundamental importância estar de acordo com a relação substrato / inóculo a ser utilizada, bem como aos diversos parâmetros que a governam, a fim de obter um processo bioquímico bem-sucedido (OBAIDEEN *et al.*, 2022).

Tais parâmetros englobam desde fatores físicos e físico-químicos, como o teor de umidade, pH e tamanho das partículas dos grãos de substrato, aos fatores bioquímicos e microbiológicos, como composição elementar (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre etc.), teores de lignina, hemicelulose, celulose, e a flora microbiológica predominante no meio anaeróbio, respectivamente (RANA *et al.*, 2018; GALBE e WALLBERG, 2019).

A exposição dos fatores regentes do processo anaeróbio busca o conhecimento detalhado da fermentação anaeróbia.

3.2.1. Fatores que influenciam na Digestão Anaeróbia

- 1) Umidade: a umidade consiste em um fator fundamental para a ocorrência da fermentação anaeróbia, uma vez que atua: i) no transporte / dispersão de nutrientes para as mais diversas regiões internas do digestor anaeróbio; ii) no transporte de microrganismos, uma vez que sua propulsão e deslocamento a regiões distantes é facilitado quando estes encontram-se em meio aquoso; iii) consiste em um elemento crucial para a quebra e sintetização de compostos orgânicos complexos através da hidrólise, além da capacidade de solubilizar tais compostos, reduzindo-os a substâncias com menores pesos moleculares, e permitindo, assim, serem assimiladas pelos microrganismos hidrolíticos e acidogênicos (CHOW *et al.*, 2020; SAILER *et al.*, 2021);
- 2) Potencial hidrogeniônico (pH): este consiste em um dos principais indicadores do progresso, interrupção ou colapso de biodigestores anaeróbios. É um fator que está diretamente associado com inúmeros outros, dentre eles a carga

orgânica (em termos de DQO e SV), presença de amônia etc. Ele governa a presença e a atuação dos microrganismos, nos vários estágios da fermentação bioquímica. Na fase hidrolítica, cátions e ânions reagem com as moléculas da água, alterando o pH do processo, que gera a clivagem de pontes de H-O. O pH do ambiente com tendência ácida, devido à hidrólise de vários compostos com elevados pesos moleculares, inicia a geração de intensa quantidade de ácidos orgânicos. À medida que fermentação anaeróbia ocorre, verifica-se uma elevação do pH ambiente, o qual é o principal “indicador” ou “termômetro” de um bom ou mau tratamento de biomassa orgânica, sendo o pH ótimo da hidrólise entre 5,0-7,0 (FILER *et al.*, 2019). Já para as bactérias formadoras de metano, um intervalo de pH entre 6,7-7,5 é considerado ótimo (DEUBLEIN & STEINHAUSER, 2008; BHARATHIRAJA *et al.*, 2018);

- 3) Granulometria: é um fator que pode afetar consideravelmente o desempenho do processo bioquímico durante a digestão anaeróbia resíduos orgânicos municipais. A redução das partículas promove o aumento da área superficial específica dos grãos, influenciando a taxa de hidrólise na digestão anaeróbia, e a fase “lag”, que consiste na fase de adaptação dos microrganismos ao substrato. Além disso, os tamanhos de partículas menores promovem a fermentação anaeróbia a mais curtos tempos de detenção hidráulica (PARRA-OROBIO *et al.*, 2017).
- 4) Sólidos voláteis (SV): consistem na parte orgânica da matéria-prima (substrato) à qual se deseja analisar. Tal parâmetro encontra-se diretamente relacionado com o sucesso ou a falha da fermentação anaeróbia, refletindo em consequências contundentes nos valores de geração de biogás e metano. Geralmente, relaciona-se um substrato com elevado índice de sólidos voláteis (>90%) como facilmente degradável. Porém, a composição da estrutura bioquímica da biomassa residual é quem indicará o grau de degradação da referida substância, uma vez que a presença de hemicelulose, celulose e lignina determinará a velocidade na qual ocorrerá a degradação (PILARSKI *et al.*, 2020; DEEPANRAJ *et al.*, 2021);
- 5) Demanda Química de Oxigênio (DQO): consiste em um parâmetro crucial no processo de avaliação do desempenho do biodigestor. Refere-se ao quantitativo de matéria orgânica (e inorgânica) de entrada (“input”) e de saída

("output") que será tratado / fermentado. Obtido em na unidade (mgO_2 / L) de biomassa, a DQO está presente no balanço de massa global do processo. Fundamentalmente, a DQO é determinada para se identificar a biodegradabilidade e a toxicidade de efluentes líquidos, sobretudo em sua correlação com a Demanda Bioquímica de Oxigênio, cujo principal objetivo é avaliar a quantidade de oxigênio necessário para a oxidação da matéria orgânica presente no meio (HARNADEK *et al.*, 2015).

- 6) Temperatura: um dos principais fatores abióticos na determinação da eficiência da digestão anaeróbia, a temperatura realiza um importante papel no desempenho do sistema de fermentação anaeróbia. Este parâmetro é fundamental para o desenvolvimento microbiano e aceleração do processo cinético das reações bioquímicas existentes nas fases da degradação. A literatura específica expõe que a velocidade de reações e de volume (fluxo) de geração de biogás é proporcional ao aumento da temperatura. Há as faixas de temperatura de atividade dos microrganismos: psicrófilas ($15\text{-}25^\circ\text{C}$), mesófilas ($25\text{-}45^\circ\text{C}$) e termófilas ($45\text{-}55^\circ\text{C}$). A faixa de temperatura mesofílica destaca-se pela grande quantidade de adeptos nos projetos de biogás e biocombustíveis existentes no mundo (WANG *et al.*, 2019).
- 7) Agitação: o processo de agitação proporciona uma homogeneização ao sistema anaeróbio, promovendo a uniformização das populações de microrganismos, distribuindo-os às várias regiões, caracterizadas por diferentes cargas orgânicas, e presença de diversos substratos orgânicos, permitindo uma aceleração da fermentação anaeróbia e geração de biogás e metano, reduzindo, conseqüentemente, o tempo de detenção hidráulica (TDH) (KEANOI *et al.*, 2014). É necessário mencionar que altas velocidades de misturas resultam em perturbações na estrutura dos grânulos presentes nos digestores em batelada, gerando instabilidades na relação sintrófica entre os microrganismos e na superfície de contato "substrato-microrganismo", e desse modo, afetando adversamente o processo de formação do biogás (RUSIN *et al.*, 2017)
- 8) Relação carbono / nitrogênio: consistindo em elementos essenciais para a formação (constituição) das milhares de macromoléculas integrantes das mais variadas biomassas existentes na biosfera, o carbono e o nitrogênio são primordiais para o pleno desenvolvimento da fermentação anaeróbia, uma vez

que, uma concentração excessiva de carbono no sistema, pode acarretar uma sobrecarga carbonácea no interior do mesmo, interrompendo a fermentação e a geração de biogás e levando-o ao colapso. Por outro lado, uma elevada concentração de nitrogênio pode resultar em uma contínua produção de compostos nitrogenados, sobretudo a amônia (NH_3) e o nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$), os quais são altamente tóxicos à flora microbiana desenvolvida em ambientes anaeróbios. De acordo com a literatura, o intervalo ideal para a ocorrência da fermentação anaeróbia dá-se com a relação $20:1 \leq \text{C} / \text{N} \leq 30:1$, sendo ótimo o valor de 25:1 (MEEGODA *et al.*, 2018; ANUKAM *et al.*, 2019).

- 9) Taxa de carga orgânica e Tempo de detenção hidráulica: a taxa de carga orgânica é um parâmetro fundamental, que descreve a quantidade de sólidos voláteis a se alimentar um biodigestor por unidade de tempo. A taxa de carga orgânica e o tempo de detenção hidráulica ideais dependem fortemente do tipo de substrato que alimentará o fermentador, uma vez que os substratos determinam o nível e a velocidade da atividade de degradação que ocorrerá no digestor (CHOW *et al.*, 2020).
- 10) Relação substrato / inóculo: este parâmetro é de grande importância para a plena ocorrência da digestão anaeróbia, uma vez que a partir desta interação, ocorre a fermentação anaeróbia agradável, bem como a geração de um biogás de boa qualidade. Uma proporção elevada de substrato / inóculo, acarreta uma sobrecarga orgânica, reduzindo o pH do sistema, podendo provocar o colapso do processo fermentativo. Por outro lado, o aumento exacerbado no volume de inóculo, pode elevar os teores de amônia e outros compostos nitrogenados, provocando uma falha no sistema. De acordo com a literatura, a faixa de valores da relação substrato / inóculo fica entre 1:1 e 1:2 (DIXON *et al.*, 2019; CASTELLÓN & GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2021). Apesar de ser possível encontrar valores entre 3:1, 2:1, porém, a determinação dessa razão é função do tipo de biomassa que é objeto da pesquisa, bem como das suas características intrínsecas (carbono, nitrogênio, hemicelulose, celulose, lignina etc.).
- 11) Flora microbiana: os fermentadores anaeróbios contêm uma flora microbiana diversificada, que varia de acordo com o tipo de biomassa que alimenta o biodigestor. Na etapa inicial, hidrolítica, membros de diversas classes, dentre elas *Clostridia*, *Alcaligenes* e *Bacilli*, realizam importante

função na digestão do material orgânico, enquanto as *Archaea* são fundamentais para a metanogênese. Considerando esta a etapa limitante de todo o processo bioquímico anaeróbio, a utilização da técnica da bioaugmentação, com a aplicação de microrganismos hidrolíticos ao processo anóxico, contribui para a otimização e a celeridade da hidrólise, elevando a qualidade dos produtos resultantes das reações bioquímicas (MENZEL *et al.*, 2020; HARIRCHI *et al.*, 2022). Os microrganismos acidogênicos, nas etapas intermediárias, são necessários para o consumo de ácidos orgânicos, como butírico, propiônico etc., bem como os microrganismos acetogênicos, da mesma forma, o são na produção de hidrogênio, dióxido de carbono, ácido acético etc. (VENKITESHWARAN *et al.*, 2015; ALINA *et al.*, 2018; ANUKAM *et al.*, 2019; MENZEL *et al.*, 2020; FERDES *et al.*, 2020; HARIRCHI *et al.*, 2022).

Após a exposição e o conhecimento dos mais variados fatores que influenciam o processo bioquímico anaeróbio, torna-se oportuna a abordagem do processo de codigestão anaeróbia, o qual tem sido amplamente difundida e adotada mundialmente por milhares de plantas de fermentação anaeróbia (CALISE *et al.*, 2021; KARKI *et al.*, 2021).

Contrariamente à monodigestão, que apresenta desvantagens substanciais, como: i) as instabilidades no biodigestor (LI *et al.*, 2018b); ii) a limitada disponibilidade de algumas matérias-primas durante todo o ano (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014), e o baixo rendimento de biogás e metano, a codigestão anaeróbia fornece uma oportunidade de superar as desvantagens da monodigestão através da digestão simultânea de duas ou mais matérias-primas (KARKI *et al.*, 2021). De acordo com Jones *et al.* (2019), das 1.200 instalações de tratamento de águas residuárias com digestão anaeróbia, nos Estados Unidos, aproximadamente 133 têm sistemas de codigestão incorporados, através da adição de fluxos de resíduos orgânicos, tais como resíduos alimentares e subprodutos residuais altamente fortes industrialmente, como a glicerina e o lodo de esgotos.

Este sistema consiste no tratamento de diversos substratos em um único digestor, no intuito de alcançar o melhor benefício sinérgico que mitigue as desvantagens, maximizando o rendimento de biogás. Estudos utilizando uma

variedade de substratos, como a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos (FORSU) (Nielfa *et al.*, 2015), capim (Cardona *et al.*, 2019), gorduras, óleos e graxas (Silvestre *et al.*, 2011), resíduos alimentares (Wang *et al.*, 2020) e dejetos animais (Bai *et al.*, 2020) têm sido desenvolvidos, tendo a codigestão como técnica fundamental para evitar a perda de qualidade em virtude de agentes inibidores da digestão anaeróbia.

Em seu experimento, Hagelqvist (2013) realizou a codigestão de 50% de sólidos voláteis de lodo de fábrica de papel, cujo substrato possui uma baixa biodegradabilidade, e 50% de sólidos voláteis de lodo de esgoto. O resultado expôs um aumento no rendimento de metano de 53 mL/gSV de lodo de fábrica de papel, para mais de 84 mL/gSV na codigestão, e um aumento da degradação de sólidos voláteis de 5 para mais de 10% (HAGELQVIST, 2013).

Estudos anteriores já haviam destacado a influência e os benefícios da produção de biogás e codigestão como sendo um termo preponderante para minimizar os fatores inibidores, majorando a fermentação biológica. Berenjkari *et al.* (2019) mencionam que ao utilizar 10%(v/v) de lixiviado de aterro na codigestão com lodo de esgoto, houve um aumento na produção de metano de 0,75 para 1,01 m³CH₄/kgSV.

Ao realizarem seu estudo, codigerindo 50% (em peso) de efluente petroquímico com lodo de esgoto, Siddique *et al.* (2017) verificaram um aumento da produção de biometano de 18 para 32%.

Já Maragkaki *et al.* (2017), estudaram a biodigestão da adição de 5% (v/v) de efluente de indústrias de azeítolas, soro de queijo e glicerol ao lodo de esgoto, e registraram aumentos da produção de biogás superiores a 220%, 350% e 86%, respectivamente.

A elevação da disseminação da biodigestão registrada nas últimas décadas, de 140 plantas de biogás, para aproximadamente 7.720, em 2013 (KABEYI & OLANREWAJU, 2022), é reflexo dos benefícios que esta classe de fermentação anaeróbia proporciona aos sistemas tecnológicos de tratamento de biomassas, os quais são: o aumento da estabilidade do sistema e do rendimento de metano através do efeito sinérgico de promover uma mais diversa comunidade microbiana (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014), um melhor balanço de nutrientes

(principalmente a relação carbono / nitrogênio (C/N) e suplementação de elementos-traço) (XIE *et al.*, 2018), uma melhoria da capacidade de tamponamento do sistema (BOLZONELLA *et al.*, 2006a), diluição de compostos tóxicos, incluindo metais pesados (EBNER *et al.*, 2016), um digestato de melhor qualidade para aplicação agrícola (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; KARKI *et al.*, 2021).

Os benefícios acima mencionados atribuem à tecnologia da digestão anaeróbia uma grande versatilidade, tendo em vista que dois ou mais efluentes podem ser utilizados como inóculos, podendo-se haver variações quanto ao tipo de substrato a ser utilizado.

3.2.2. O uso de um digestato de biodigestor anaeróbio como um potencial agente alcalinizante

O digestato é o fluido aquoso resultante do processo de digestão anaeróbia da matéria orgânica. Composto por uma flora microbiana adaptada ao ambiente anaeróbio e contendo características físico-químicas coerentes, o digestato é submetido a um período de autodepuração, no qual ocorre a biodegradação e bioestabilização da matéria orgânica, transformando tal efluente em um agente alcalinizante. Isto pode contribuir para proporcionar um ambiente favorável e reduzir fatores que provoquem possíveis inibições.

De acordo com Pöschl *et al.* (2010) e Marder *et al.* (2021), os digestatos, na condição de inóculos, têm sido uma ferramenta viável e sustentável na condição de alternativa para a gestão de resíduos sólidos, sobretudo quando o sistema global apresenta um balanço energético favorável. A utilização de um inóculo eficiente (material substância previamente incubada sob condições anaeróbias – digestato) tem melhorado, consideravelmente, a eficiência da produção de biogás numa faixa de temperatura ideal (em torno de 35°C) (DECHRUGSA *et al.*, 2013). Quando autodepurados sob a temperatura à qual o biorreator vai operar, os inóculos “pós-depurados” contribuem para a estabilidade da biomassa, bem como a favor do desenvolvimento da microbiota específica. O tempo de aclimação é fundamental para a melhoria da eficiência do inóculo (STEINMETZ *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017; MARDER *et al.*, 2021).

Alguns estudos têm relatado que alterações internas de temperatura nos biodigestores tornam a produção de metano inviável (AHN & FOSTER, 2002; ELANGO *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2020; MARDER *et al.*, 2021), porém nenhum deles faz uso de inóculos para superar tais problemas. A hipótese de que o uso de um inóculo aclimatado poderia melhorar a produção de metano de biomassas incubadas em locais à temperatura ambiente (32°C-35°C) foi levantada visando a reduzir os custos de produção de biogás, bem como melhorar o balanço energético global, possibilitando, portanto, sua popularização em regiões com clima temperado (MARDER *et al.*, 2021).

Quando coletados (ou extraídos) de um biodigestor oriundo de uma planta de biogás, um digestato apresenta valores de parâmetros físico, bioquímicos e microbiológicos característicos do ambiente originário ao qual estava submetido, sendo necessário condicioná-lo à nova situação em que será submetido o seguinte processo fermentativo anaeróbio (NSAIR *et al.*, 2020).

Enquanto alguns estudos foram desenvolvidos fazendo-se uso do processo de alimentação para a manutenção da flora microbiana, outros fizeram uso da manutenção do digestato, proveniente de um biodigestor de planta de biogás, privando-o de alimentação (MARDER *et al.*, 2021). Ao manter este tipo de tratamento sob condições ambiente ($P_{atm} = 101,3 \text{ kPa}$, $T = 20^\circ\text{C}$), possibilita-se a ocorrência do processo de autodepuração do digestato, que consiste na fermentação e degradação da própria matéria orgânica existente no mesmo. Isto proporciona a redução da carga orgânica, em termos de DQO, sólidos suspensos, sólidos voláteis, bem como a elevação do pH do sistema, reduzindo, desta forma, o potencial poluidor do referido digestato.

Este processo de autodepuração do digestato é fundamental para a bioestabilização do digestato, que vai torná-lo uma substância importante para o sucesso da digestão anaeróbia (CHEN *et al.*, 2008; SERRANO-MEZA *et al.*, 2020). Além disso, o digestato maturado, tem potencial de proporcionar (adicionar) comunidades bacterianas, micro e macronutrientes, carga orgânica, umidade, podendo se tornar um agente alcalinizante ao sistema de fermentação (LOGAN & VISVANATHAN *et al.*, 2019).

3.3.A Biotecnologia aplicada à Digestão Anaeróbia

A utilização de consórcios microbiano dá-se pelo fato de estas “comunidades” serem capazes de realizar tarefas que seriam impossíveis para um único indivíduo. Muitos estudos sobre co-culturas de microrganismos têm apresentado suas vantagens sobre culturas puras, em termo de produtividade e economia do processo (BHATIA *et al.*, 2018).

Os consórcios microbianos podem ser uma ótima opção para lidar com situações, como: i) a necessidade de usar fontes de carbono complexas e com uma ampla gama, o que é impossível para um único organismo; ii) a necessidade de construir uma via biossintética longa, que pode resultar em uma baixa produtividade, com um organismo simples; e iii) determinados produtos da fermentação podem ser tóxicos para organismos individuais, o que, quando em conjuntos / consórcio, têm capacidade de suportar tais instabilidades ambientais (BHATIA *et al.*, 2018).

Estes consórcios de microrganismos conseguem interagir entre seus membros por meio de diferentes formas, incluindo comensalismo e mutualismo. Interações entre estes consórcios definem a estrutura dos consórcios permitindo desempenhar funções, tais como a divisão de tarefas, alimentação simultânea das várias espécies existentes no consórcio (alimentação cruzada), fornecimento de sustentação para suportar a mudanças ambientais (HAYS *et al.*, 2015; BHATIA *et al.*, 2018).

Constituindo-se no principal obstáculo do uso do consórcio microbiano na Engenharia de Bioprocessos, o controle da composição do consórcio durante a fermentação é crucial, a fim de que o mesmo execute suas tarefas de forma plena, sem perda (ou prejuízo) na qualidade do produto final do bioprocessos (BHATIA *et al.*, 2018).

Embora uma grande quantidade de pesquisadores esteja trabalhando intensamente para estabelecer os consórcios microbianos para aplicações biotecnológicas, há, até o momento, poucos estudos bem-sucedidos. O uso de culturas puras tem sido preferível ao uso de culturas sintéticas (ou desenvolvidas em laboratório). Embora o consórcio microbiano possa melhorar a economia e a

produtividade dos processos industriais, consideráveis esforços são necessários para fazer desse conceito realidade (BHATIA *et al.*, 2018).

De acordo com Bernstein & Carlson (2012) e Bhatia *et al.* (2018), os consórcios microbianos são compostos por populações de microrganismos que podem crescer em conjunto. Consistem em consórcios naturais (ou artificiais) que são mais robustos do que as monoculturas (BRENNER *et al.*, 2008). Tais consórcios possuem a seguinte classificação: i) consórcio microbiano natural: consiste em um grupo de microrganismos que são encontrados vivendo simbioticamente em conjunto na natureza; ii) consórcio microbiano artificial: em um consórcio microbiano artificial, diferentes microrganismos selvagens que podem se desenvolver simbioticamente estão crescendo em um sistema fechado, visando à produção de produtos valiosos, economicamente; iii) consórcio microbiano semissintético: neste tipo de consórcio, microrganismos selvagens ou “engenheirados” são cultivados em conjunto para cumprir um objetivo em comum; iv) consórcio microbiano sintético: esta classe inclui coculturas de microrganismos que são metabolicamente engenheirados para melhorar suas funções e produtividade (BRENNER *et al.*, 2008; BHATIA *et al.*, 2018; CIFUENTES & ÖZTÜRK, 2020).

A terminologia “projetado” confere ao consórcio de microrganismos uma versatilidade para suportar condições ambientais e bioquímicas adversas, as quais são fortemente nocivas para organismos individuais (BHATIA *et al.*, 2018), proporcionando, portanto, uma característica de suma importância: a elevada resiliência ambiental.

Esta característica encontra-se presente entre os objetivos de inúmeros estudos relacionados à utilização de consórcios microbianos na degradação de resíduos sólidos urbanos (BHATIA *et al.*, 2018; BRAVO *et al.*, 2019).

Consistindo em um promissor método de introdução de microrganismo em sistemas de fermentação anaeróbios, a bioaugmentação é utilizada tanto para aplicação de culturas puras quanto de consórcios de microrganismos. Esta técnica tem exercido grande função, sobretudo no processo de hidrólise da matéria orgânica, a qual consiste na fase limitante do processo anaeróbio, proporcionando celeridade biodegradação (STRANGE *et al.*, 2017).

Dargode *et al.* (2020) projetaram um consórcio sintético específico para melhorar o rendimento de produção de biogás. Foi realizada uma comparação, em termos de atividade, entre uma cultura pura e um consórcio sintético (que é uma forma resumida dos consórcios naturais, nos quais há preservadas as interações microbianas) em atuação em um biodigestor em batelada. Os rendimentos teóricos máximo de biogás, obtidos com o consórcio “sintético” e o consórcio natural foram, respectivamente, 66% e 60%. É importante destacar que a completa conversão do substrato e a constatação da estabilização da degradação foram verificados no 7º dia, com o consórcio sintético, e no 35º dia de fermentação. Assim sendo, nesta pesquisa, foi observado que, com a utilização do consórcio sintético, foi necessário apenas 20% do tempo de detenção hidráulica usado pelo consórcio natural (DARGODE *et al.*, 2020).

Dois consórcios termofílicos celulolíticos mistos estáveis, denominados AD1 e AD2, foram utilizados para enriquecer um biodigestor industrial para produção de biogás. O processo de bioaugmentação ocorrido em escala de batelada, em laboratório, com ambos os consórcios de microrganismos aumentou o rendimento de biogás em 22% (AD1) e 24% (AD2) (STRANGE *et al.*, 2017).

De acordo com Susmitha *et al.* (2019), uma cultura pura do gênero *Bacilli* *sp.*, oriundo de esterco de vaca, foi desenvolvida, sendo avaliada a sua atividade durante a hidrólise inicial da matéria orgânica na planta de biogás. Foi realizada a fermentação do esterco de vaca e resíduos vegetais durante o período de 60 dias de tempo de detenção hidráulica. Observou-se que, nas primeiras 24 horas, foi produzido um volume de cinco litros de metano. A combinação de 30 kg de resíduos vegetais 2,25 L de inóculo gerou 1 m³ na planta de biogás, quando da aplicação do consórcio bacteriano estável desenvolvido. O inóculo foi eficiente em volume, no intervalo de 25 – 40 mL / kg de esterco de vaca. O estudo mostrou que o uso do biogás à base de esterco de vaca pode ser substituído por ¼ de esterco, uma quantidade semelhante ao de lixo orgânico e inóculo bacteriano.

Um total de dez amostras foram coletadas de um aterro de resíduos sólidos urbanos, localizado nos municípios de Dhapa e Barrackpore (Índia), e nove bactérias foram isoladas e cultivadas, usando meio ágar nutriente. Testes de condições ótimas de cultivo, características microbiológicas, bioquímicas, atividades antagônicas, sinérgicas dentro das cepas, tolerância a cinco metais

pesados (As, Zn, Pb, Ag e Cd), etc. foram realizados. Dentre os nove isolados, seis exibiram produção de protease, sendo um escolhido. Todas as seis cepas foram capazes de produzir protease, sendo aprovadas no teste de eficiência de degradação de resíduos. Assim, tais resultados aumentam as possibilidades de encontrar bactérias industrialmente importantes em regiões de despejo de resíduos sólidos urbanos, podendo, também, estes isolados ser uma fonte vital para a descoberta de enzimas / moléculas industrialmente úteis (SAHA & SANTRA, 2014).

Embasando-se nos testes de isolamento e na caracterização microbiológica realizados por Saha & Santra (2014), assim como nas metodologias descritas por Rose & Müller (1939), ANVISA (2004), Madigan *et al.* (2004), os quais permitem obter um conhecimento acerca do comportamento e atividades dos microrganismos presentes, bem como os fatores e as substâncias que as inibem e que as otimizam. Após esta etapa, os testes de antagonismo e sinergismo são fundamentais para avaliar a elaboração de consórcios microbianos visando realizar uma função específica, no processo fermentativo anaeróbio.

3.3.1. A cepa *Bacillus subtilis*

A espécie *B. subtilis*, descoberta em 1872, é predominantemente encontrada nos solos ou em associação com plantas. É uma espécie bacteriana Gram-positiva mais estudada, sendo caracterizada por ter uma membrana citoplasmática e uma espessa parede celular. Morfologicamente, possui forma de bastão e aproximadamente, 4-10 µm de comprimento, bem como, 0,25-1 µm de diâmetro. Durante muito tempo, havia sido considerado um organismo estritamente aeróbio, sendo, após comprovação científica, considerado anaeróbio facultativo. Sob algumas condições especiais, a espécie *Bacillus subtilis* pode ativar o processo celular de formação de endósporo, o que permite que uma subpopulação sobreviva a ambientes de extrema temperatura e seca. Consiste numa espécie fortemente flagelada, o que promove a esta, grande motilidade em meio líquido (GINGICHASHVILI *et al.*, 2019).

Dentre outras espécies, a *B. subtilis* apresenta-se como uma excelente ferramenta biológica para a produção em ampla escala de produtos bioquímicos de alto valor. Esta espécie constitui-se na mais bem caracterizada espécie Gram-

positiva, sobretudo por ser considerada segura para fins de manipulação e procedimentos biológicos. Além disso, possui as vantagens de ser uma espécie com alta facilidade de manuseio e baixo custo, para fins de desenvolvimento de culturas com elevada densidade celular (SU *et al.*, 2020).

Ante todos estes benefícios proporcionados pela *B. subtilis*, depreende-se a razão pela qual esta cepa tem sido alçada como o organismo procarioto mais popularmente utilizado para o desenvolvimento, em larga escala, de produtos industriais dos ramos farmacêutico, alimentício, empregando embasamento biotecnológico (SU *et al.*, 2020).

No que tange ao seu comportamento no meio ambiente, é pertinente mencionar que, de acordo com Su *et al.* (2020), a *B. subtilis* tem aptidão para ser utilizado como agente biológico contra uma ampla gama de fitopatógenos. Estudos desenvolvidos sobre metabólitos antifúngicos secretados por esta bactéria confirmam a presença de sideróforos (compostos orgânicos que atuam na captação do ferro pelos microrganismos) e várias enzimas hidrolíticas, como protease, quitinase, amilase e lipase.

Segundo estudo realizado por Vijayadeep & Sastry (2014), microrganismos Gram-positivos como as espécies *Bacillus sp.* apresentam menor resistência à presença (concentração) de metais no ambiente, quando comparados aos microrganismos Gram-negativos. El-Gayar (2017), em experimento realizado para avaliar a susceptibilidade de microrganismos à presença de metais pesados, dentre eles, o *B. subtilis*, verificou que este *B. subtilis* foi tolerante ao cromo (Cr), mesmo a elevadas concentrações deste elemento. Por sua vez, os elementos chumbo (Pb), cobre (Cu), zinco (Zn) afetaram o crescimento do *B. subtilis* quando submetido a concentrações superiores a 150 mg/L. Também foi sensível a prata (Ag), cádmio (Cd) e mercúrio, a concentração mínima inibitória comprovada de 25 mg/L (AWNY *et al.*, 2018).

No que tange à produção máxima de biomassa composta por *B. subtilis* (em unidades formadoras de colônias, UFC), sob ambiente com presença de extrato de levedura (em concentrações de 0,1%, 0,5% e 1,0%), El-Gayar (2017) identificou que a produção de biomassa é diretamente proporcional às aplicações de concentrações crescentes de extrato de levedura, cujo pico

máximo ocorre à concentração de 1,0%, correspondendo, respectivamente, a log 8 UFC/mL. O *B. subtilis*, sob ambientes salinos (com concentrações de 0,5%, 2%, 5% NaCl), respondeu com um decaimento gradual de UFC, com concentrações de log UFC/mL de 6,6, 6,0 e 5,7, respectivamente, indicando uma baixa resistência deste organismo a ambientes salinos (VESHAREH *et al.*, 2018).

No que diz respeito ao comportamento da cepa perante o potencial hidrogeniônico do ambiente, realizando-se testes de resistência da cepa *B. subtilis*, sob valores de pH de 4, 7 e 10, El-Gayar (2017) observou o maior crescimento a pH neutro (pH = 7,0), no qual atinge uma concentração de 6,5 log UFC/mL. Em ambiente ácido (pH = 4,0), este organismo apresenta uma concentração atingindo o valor de 4,5 log UFC/mL. Já em ambiente alcalino (pH = 10,0), tal organismo expõe uma ligeira queda no seu desenvolvimento, atingindo 6,2 log UFC/mL.

Já no que diz respeito à temperatura, El-Gayar (2017) constatou o melhor desenvolvimento da referida cepa quando ela foi submetida à temperatura mesofílica de 37°C, cuja concentração atingiu 6,6 log UFC/mL. Os ambientes sob temperaturas de 30°C e 48°C apresentaram valores de concentrações de 5,9 e 5,3 log UFC/mL, respectivamente. Portanto, a eficiência térmica de crescimento desta cepa descreveu a seguinte ordem: 37°C > 30°C > 48°C.

Outra análise realizada por El-GayAr (2017), diz respeito ao desempenho do *B. subtilis*, quando este é submetido a testes de sensibilidade a alguns metais, como o Mercúrio (Hg), Cádmio (Cd), Prata (Ag), Cromo (Cr), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Chumbo (Pb), sob concentrações de 25, 50, 100, 150 mg/L. El-GayAr (2017) destaca que, quando na presença dos metais pesados Mercúrio, Cádmio e Prata, sob concentrações de 25, 50 e 100 mg/L, foi observado um contínuo e constante crescimento desta espécie, visto que houve um aumento do diâmetro do halo de colonização bacteriana, atingindo, respectivamente, na presença de mercúrio, 9,0, 17,0 e 20,0 mm, na presença de cádmio, 19,0, 25,0 e 27,0 mm, e na presença de Prata, 14,0, 15,0 e 20,0 mm. Não foi identificada resposta bacteriana, quando submetida à presença de mercúrio, cádmio e prata, sob a concentração de 150 mg/L.

Por outro lado, quando exposta ao cromo, zinco, cobre e chumbo, sob as mesmas concentrações supracitadas (25, 50, 100 e 150 mg/L), a *B. subtilis* apresentou um “tímido” desempenho, endossando a afirmação de que alguns metais, quando em determinadas concentrações, apresentam elevado potencial inibidor de atividade biológica (SEVINC & DEMIRKAN, 2011; EL-GAYAR, 2017).

3.3.2. A cepa *Alcaligenes faecalis*

A cepa *Alcaligenes faecalis* consiste em uma espécie em formato de haste gram-negativa aeróbia, não fermentativa, móvel, com flagelos peritricos (localizados em toda a superfície bacteriana) (BIZET & BIZET, 1997; TENA *et al.*, 2015). Esta cepa é assim denominada por ter a capacidade de produzir uma reação alcalina em determinados meios (SACHDEVA *et al.*, 1963). A *A. faecalis* é a espécie da família *Alcaligenaceae* mais frequentemente manipulada e isolada em laboratórios clínicos. Esta cepa é encontrada em solos e corpos d'água, bem como na flora intestinal de seres humanos e em ambientes hospitalares. Esporadicamente, provoca lesões ou processos inflamatórios em organismo humano. O tratamento de infecções causadas por *A. faecalis* são, geralmente, difíceis por causa da elevada resistência que este microrganismo apresenta a antibióticos.

Em estudos piloto, cepas de *Alcaligenes faecalis*, isolados de guelras de *Argyrosomus regius*, sob excelentes condições *in vitro*, têm mostrado o potencial probiótico, em peixes, devido à atividade inibitória contra os principais microrganismos patogênicos dos peixes (GUTIÉRREZ-FALCÓN *et al.*, 2020; GUTIÉRREZ-FALCÓN *et al.*, 2021).

Uma pesquisa conduzida por Nuansawan *et al.* (2018) estudou a influência da bioaugmentação, com a cepa *A. faecalis*, sobre o desempenho do tratamento de lixiviado concentrado (com baixa emissão de gases de efeito estufa (GEEs)) em biorreator com membrana de dois estágios. Operando em um tempo de retenção hidráulica de 2,5 dias e 1 dia, em cada biorreator, sob presença e ausência de recirculação de lodo, a bioaugmentação com *A. faecalis* ajudou a aumentar o carbono orgânico e remover os compostos nitrogenados, enquanto reduz as emissões de metano e óxido nitroso (NUANSAWAN *et al.*, 2018).

Os estudos supramencionados, bem como outros trabalhos, expõem os inúmeros esforços empregados para o desenvolvimento de espécimes ou conglomerados microbianos, através da Engenharia Biotecnológica, e a sua aplicação na digestão anaeróbia de biomassas, buscando torná-la um fator-chave para o melhoramento do processo bioquímico (KROHN *et al.*, 2022).

3.4.O Potencial Bioquímico do Metano de biomassas

Visando obter o potencial máximo de geração de metano, embasando-se no processo de digestão anaeróbia, o ensaio BMP consiste numa técnica amplamente adotada e utilizada por estudiosos de diversos países no mundo (AMODEO *et al.*, 2020).

Desenvolvida inicialmente por Owen *et al.* (1979), e posteriormente aprimorada por Angelidaki e Sanders (2004), Hansen *et al.* (2004) e diversos outros pesquisadores, o teste BMP tem sido largamente utilizado, sobretudo, pela sua grande versatilidade, uma vez que tem capacidade de ser aplicado em diferentes escalas, micro, meso e macroescala, bem como utilizando-se de inúmeros substratos e inóculos.

Com as energias renováveis em forte ascensão, em função das mudanças climáticas, a técnica da biodigestão de resíduos sólidos e líquidos tem se tornado fundamental para a diversificação da matriz energética das grandes economias do mundo.

O teste do Potencial Bioquímico do Metano (ou *Biochemical Methane Potential Test*) consiste na quantidade máxima de metano que pode ser recuperada de um substrato por unidade de massa do substrato, como matéria orgânica (sólidos voláteis), ou demanda química de oxigênio (DQO) (KOCH *et al.*, 2020). As aplicações gerais do teste BMP são: i) determinação do potencial de metano resultante da fermentação de um substrato; ii) uma opção para medição do impacto de um pré-tratamento sobre a degradabilidade de um substrato (JANKE *et al.*, 2019). O fornecimento de condições ótimas operacionais é de fundamental importância para alcançar o mais alto grau de degradação possível. Portanto, as condições a que são submetidas em um teste BMP visam o melhor ambiente possível para o desenvolvimento microbiano

(KOCH *et al.*, 2020). Isto também inclui o uso de inóculos oriundos de um digestor em bom sistema de funcionamento (RAPOSO *et al.*, 2011).

Neste intuito, vários pesquisadores têm desenvolvido pesquisas visando à determinação do potencial de geração de biogás e metano oriundo de resíduos sólidos (SCHIRMER *et al.*, 2014; SANTOS FILHO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2022).

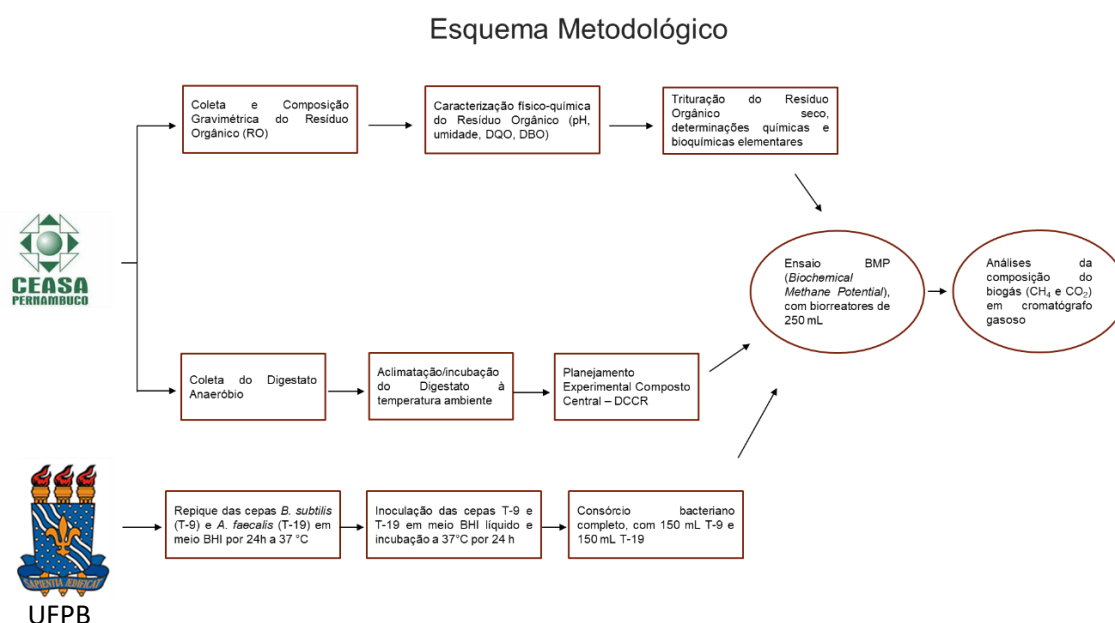
De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e a Organização Panamericana de Saúde, aproximadamente 2,1 bilhão de toneladas de alimentos são perdidas, anualmente. Tais resíduos possuem um elevado potencial de geração de biogás e metano, sendo um excelente insumo para a digestão anaeróbia, potencializando a propagação desta tecnologia em diversos países (BLASIUS *et al.*, 2020; SHIN *et al.*, 2022).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta as metodologias adotadas para a execução do referido trabalho. Locais de coleta de substrato e obtenção de inóculos, análises de composição física e físico-química, pré-tratamento, planejamento experimental e realização do ensaio BMP, monitoramento diário da produção de biogás nos biorreatores BMP, determinação da quantidade de metano e dióxido de carbono presentes no biogás.

O procedimento metodológico da pesquisa se encontra exposto na Figura 2.

Figura 4 - Procedimento metodológico experimental da pesquisa



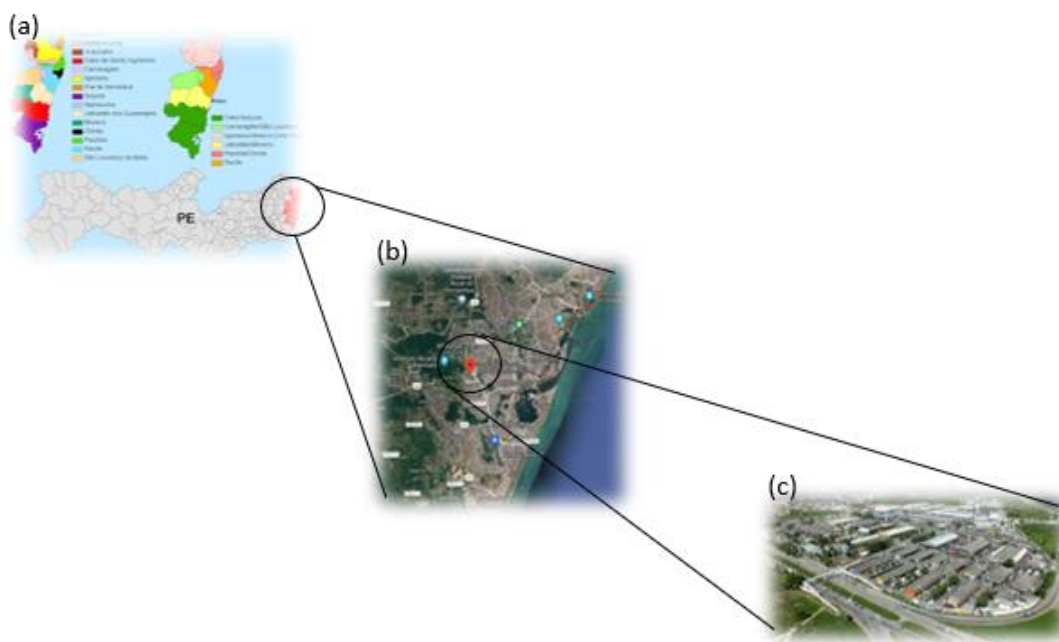
Fonte: O autor (2022)

4.2. Coleta e composição gravimétrica do substrato (resíduos orgânicos hortifrutigranjeiros) (RO)

Uma coleta pontual de resíduos orgânicos hortifrutigranjeiros foi realizada no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (Ceasa-PE), conforme apresentado na Figura 5, através de um convênio existente o Ceasa-PE e o Grupo de Resíduo Sólidos da Universidade Federal de Pernambuco (GRS-UFPE), que visa a estudar o potencial da biodigestão e geração de biogás e metano de resíduos sólidos orgânicos hortifrutigranjeiros (BRITO *et al.*, 2021).

Os referidos resíduos foram coletados no galpão GLP-II, localizado no Mercado dos Produtores, o qual compreende também os galpões GLP-I e GLP-III. Os galpões comercializam verduras e diversos (GLP-I), abacaxi, cenoura e coco seco (GLP-II), e melancia, jerimum, folhosos (GLP-III) (NASCIMENTO, 2008).

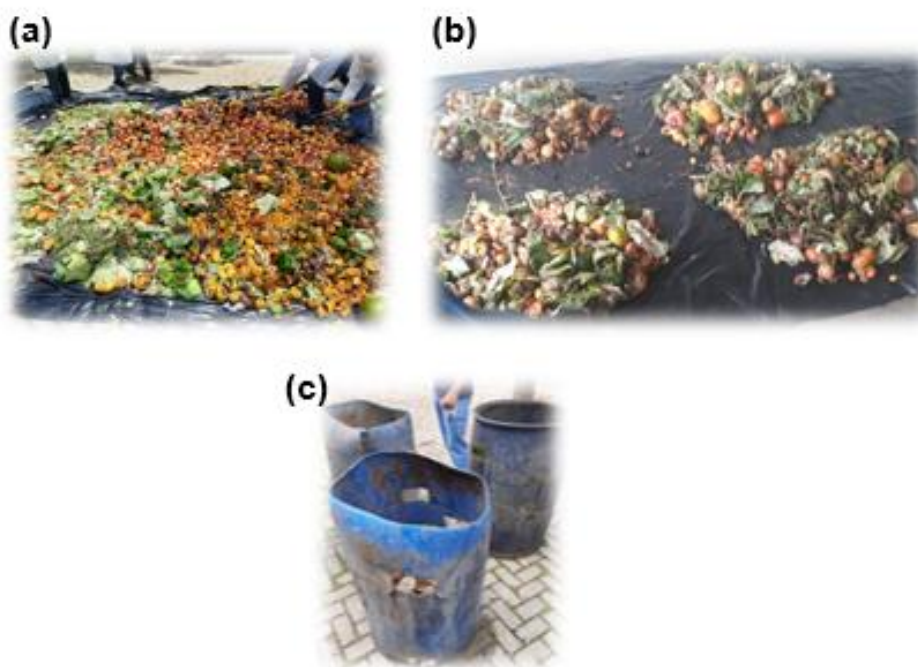
Figura 5 - Identificação geográfica do local de coleta dos resíduos hortifrutigranjeiros, nos âmbitos: a) Estadual; b) Regional; e c) Municipal



Fonte: a) ResearchGate.net; b) Google Maps; c) Ceasa-PE

Para tanto, inicialmente, foi descarregado sobre o solo e quarteado, *in loco*, um montante em torno de 150 kg de resíduos orgânicos hortifrutigranjeiros (Figura 6 a). O quantitativo resultante, 80 kg, foi colocado em baldes de 20 L (Figura 6 c) e levados ao Laboratório do Grupo de Pesquisa e Tecnologias Ambientais (GPTA), do Departamento de Engenharia Química da UFPE, onde, após realizadas mais duas etapas de quarteamento, obteve-se um volume amostrado final de 30 kg (Figura 6 b) (MARIANO *et al.*, 2007; SANTOS FILHO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Figura 6 - (a) Coleta; (b) Quarteamento; (c) Composição gravimétrica dos resíduos orgânicos hortifrutigranjeiros.



Fonte: O autor (2022)

A etapa de composição gravimétrica foi realizada com o intuito de determinar as frações de cada tipo de resíduos presentes no universo amostrado, ou seja, no montante final selecionado.

Desta forma, utilizando-se baldes plásticos de 10 e 20 litros, assim como uma Balança Digital Elgin 30 kg / 0,005 kg, a fim de efetuar o registro das pesagens. A gravimetria foi assim composta pelas tipologias: 1) Leguminosas; 2) Frutas; 3) Folhosos.

Na sequência, com o auxílio de facas do tipo “peixeira” e de tesouras do tipo jardinagem, foi realizado o processamento manual de corte dos resíduos, a fim de reduzir a granulometria do substrato (tamanhos das partículas de $\Phi = 10$ mm) e aumentar a superfície de contato entre os resíduos e o ambiente, permitindo assim, uma mais rápida transferência de massa e degradação da biomassa (MONTGOMERY & BOCHMANN, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2018, 2021; ABRAHAM *et al.*, 2020; KASINATH *et al.*, 2021).

4.2.1. Determinações de parâmetros físico-químicos (Umidade, pH, Demandas Química e Bioquímica de Oxigênio, Sólidos Voláteis)

Realizado o processamento dos resíduos anteriormente mencionado, para a determinação do teor de umidade, foram pesadas pequenas frações de amostras de resíduos, *in natura*, em bandejas de alumínio, previamente taradas, e submetidas à temperatura constante de 105°C, em estufa de secagem e esterilização SPLabor, até peso constante (SANTOS *et al.*, 2020; SERUGA & KRZYWONOS, 2021).

Posteriormente, os resíduos, na condição seca, foram submetidos à etapa da trituração, na qual foi utilizado um moinho de facas tipo Willey SL-31, a fim de reduzir sua granulometria a $\Phi = 2$ mm, e proporcionar maior degradabilidade bioquímica aos resíduos (XIAO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2020).

De posse dos resíduos triturados (em pó), foi preparada, em um béquer de vidro de 500 mL, uma solução composta por 25 g do substrato e 500 mL de água destilada, submetida a 8 minutos de agitação constante e moderada. Finalizada a agitação, foi realizada a determinação do pH da solução, utilizando-se de um eletrodo Digimed DME-CV2, específico para aferição de pH, conforme a metodologia descrita por Lange *et al.* (2002).

Foi realizada a Demanda Química de Oxigênio, pelo método colorimétrico. Alíquotas do extrato amostrado, descrito por Lange *et al.* (2002), foram solubilizadas em água destilada, em solução de 1:100, inseridas em tubos de vidro rosqueado (16x100 mm), e digeridas, com o auxílio das soluções catalisadora (H_2SO_4) concentrada (95-97% de pureza), da marca Merck e digestora ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N), da marca Sigma-Aldrich, em um bloco digestor (termorreator) WTW 1P21 CR 2200, durante 2 horas, sob a temperatura de 150°C. Em seguida, foi efetuada a leitura dos tubos, em um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 180 UV-Visível, sob comprimento de onda de $\lambda = 620$ nm, conforme metodologia colorimétrica descrita por APHA (2005).

Obtidos os resultados de DQO, a determinação da DBO é realizada pelo método de incubação em estufa específica para análises físico-químicas, durante 5 dias, a 20°C, usando o kit de OxiTop, composto pela mesa agitadora, oxímetros e frascos (sendo estes frascos do tipo âmbar 500 mL).

Primeiramente, conhecido o valor da DQO da amostra, consulta-se uma tabela do fator de multiplicação, segundo o volume da amostra e da faixa de medição. Dessa forma, a partir do valor de DQO encontrado, coleta-se o volume de amostra necessário para a realização da DBO. Amostras com carga orgânica muito alta, necessitam de volumes pequenos de amostra e vice-versa. Sabendo-se do volume de amostra necessário para a realização da análise, este é para dentro de cada frasco, adicionando-se, em seguida, o inibidor nitrificante. Tal agente visa evitar a ocorrência da oxidação via nitrificação (OxiTop DIN EN 1899-2, 1998). Em seguida, coloca-se o suporte de borracha com as pastilhas de NaOH (hidróxido de sódio), fechando-se, posteriormente, o frasco com o oxímetro. É iniciada a contagem temporal, bem como do processo de oxidação da matéria orgânica. Os frascos são, então, levados à incubadora, durante 5 dias a 20°C (APHA, 1992; CONZELMANN *et al.*, 1996; REUSCHENBACH *et al.*, 2003; JOUANNEAU *et al.*, 2014).

A determinação dos teores de sólidos totais (Eq. 1) e voláteis (Eq. 2) do substrato foi realizada através da queima, em um forno mufla da marca EDG 1800, durante 2h30min, à temperatura de 550°C, de 5 g deste material, inseridos em cápsulas previamente taradas (P_1), secos em estufa de secagem e esterilização e pesado (P_2), e posterior pesagem após a calcinação do material orgânico (P_3), conforme a Equação 01 (APHA, 1992).

$$ST (g * gMS^{-1}) = M_{AB} - W \quad \text{Eq. 01}$$

$$SV (g * g^{-1}ST) = \left(\frac{P_2 - P_3}{P_2} \right) - P_1 \quad \text{Eq. 02}$$

Onde:

SV = teor de sólidos voláteis ($g \cdot g^{-1}ST$);

P_1 = peso da cápsula (g);

P_2 = peso da amostra após a secagem na estufa (g);

P_3 = peso da amostra após a calcinação (g);

ST = teor de sólidos totais (g);

MS = matéria seca (g);

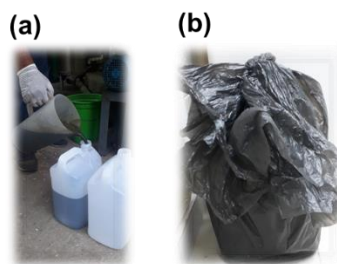
M_{AB} = massa da amostra bruta (g);

W = umidade (g).

4.3. Coleta, Análises físico-químicas e Autodepuração do Digestato (DG)

O digestato utilizado no presente estudo foi coletado, de forma pontual, em uma planta de tratamento e digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos localizado no Ceasa-PE, conforme mencionado por BRITO *et al.* (2021). A coleta deste material visou verificar seu desempenho como um substituto ao lodo de esgoto na digestão anaeróbia e geração de biogás de resíduos hortifrutigranjeiros, uma vez que o digestato constitui-se num efluente resultante da fermentação anaeróbia de matéria orgânica, cuja microbiota é originária daquele ecossistema.

Figura 7 - (a) Coleta e armazenamento de 10 litros de digestato em bombonas; (b) Envolvimento das bombonas com o digestato em sacos plásticos pretos.



Fonte: O autor (2021)

Para tanto, foram coletados 10 litros do referido líquido em duas bombonas plásticas de 5 litros (Figura 7 a), e envolvidos em sacos pretos, a fim de minimizar a influência de fatores externos abióticos na atividade fermentativa anaeróbia (Figura 7 b).

Ao chegar no Laboratório de Resíduos Sólidos do GPTA, as bombonas foram mantidas estáticas (sem movimentação), em ambiente com uma mínima iluminação, à temperatura ambiente de 20°C, à pressão atmosférica de 1 atm (101,3 kPa), a fim de permitir a realização do processo de autodepuração do digestato, ou seja, ocorrendo a elevação do valor do pH e redução da carga orgânica, em termos de DQO e sólidos totais e voláteis.

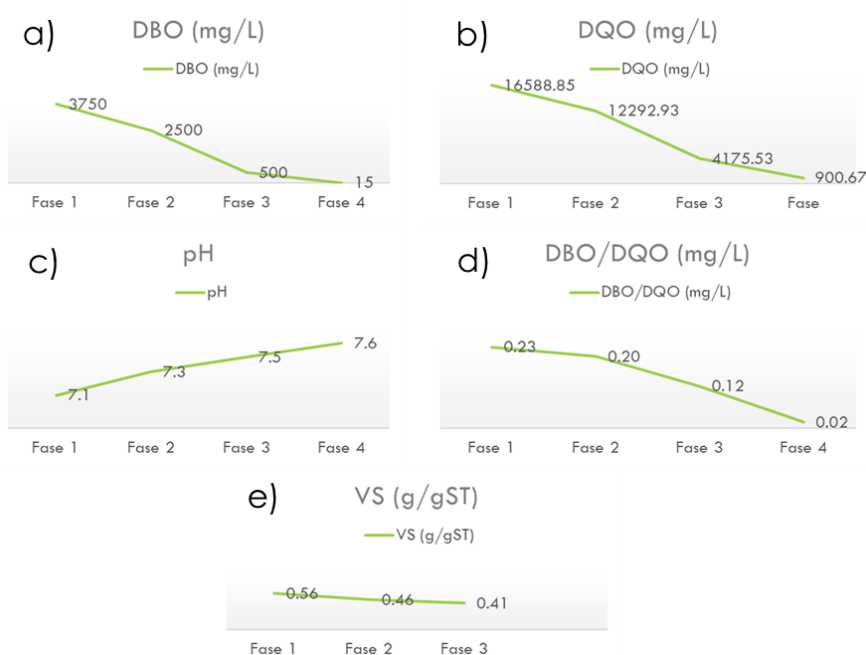
Tais parâmetros foram analisados, conforme metodologia supracitada, periodicamente, o que permitiu, um acompanhamento detalhado da degradação do digestato. Todo este processo objetivou evitar que os parâmetros ambientais

mencionados (DBO, DQO, pH, ST e SV) interferissem negativamente no processo bioquímico fermentativo, podendo culminar com o colapso do sistema, uma vez que uma alta carga orgânica potencializa a geração de ácidos orgânicos, resultando na acidificação do processo (CHEN *et al.*, 2008)

O digestato ficou sob o processo de autodepuração durante um período de aproximadamente 150 dias. A literatura específica fundamentalmente incuba o digestato sob curtos períodos (15-30 dias), e para diferentes finalidades, sobretudo microbiológicas (YANGIN-GOMEZ *et al.*, 2020; MARDER *et al.*, 2021).

Constituindo-se em um potencial inóculo para a realização da digestão anaeróbia, o digestato utilizado no estudo foi submetido a um período de autodepuração, a fim de promover o processo de autodepuração (“autobiodegradação”) do inóculo, conforme poder ser observado na Figura 8.

Figura 8 – Resultados dos parâmetros físico-químicos do digestato: (a) e (b) Demanda bioquímica e química de oxigênio; (c) Potencial hidrogeniônico; (d) razão biodegradação referente ao inóculo; e (e) Percentual de sólidos voláteis presentes no efluente.



Fonte: O autor (2021)

A Figura 8 expõe, em detalhes, informações acerca do período de autodepuração do digestato (TDH = 150 dias). Tal processo bioquímico, também podendo ser denominado como autodepuração do efluente, permite que, haja a

decomposição do material e redução de carga orgânica, sem a necessidade de adição de qualquer agente químico.

Na fase inicial, observou-se, principalmente, uma elevada quantidade de compostos orgânicos, apresentados na Figura 10 como DBO, DQO, relação DBO/DQO e sólidos voláteis. Tais características mostram que tal efluente poderia contribuir fortemente para uma possível acidificação, podendo culminar com o colapso da biodigestão.

As quatro fases do processo de autodepuração foram definidas, exclusivamente, visando determinar os níveis de biodegradabilidade do digestato. Ou seja, dentre os parâmetros regentes da digestão anaeróbia (DBO, DQO, pH e SV), o pH consistiu no fator norteador, que orientou e estabeleceu o momento certo para a utilização deste material na condição de inóculo. A utilização como digestato ocorreu quando o pH atingiu o valor de 7,6 (Figura 8 c), buscando, com o digestato nestas condições, proporcionar condições adequadas para a degradação anaeróbia.

O período de autodepuração do digestato baseou-se, fundamentalmente, na elevação dos valores do pH do sistema, visto que este consiste em um parâmetro chave para o sucesso da fermentação.

O intervalo de tempo entre cada uma das quatro fases foi determinado em $t \approx 50$ dias. Desta forma, é importante destacar que as determinações físico-químicas referentes às Fases 1, 2, 3 e 4 ocorreram, respectivamente, nos dias 1º, 51º, 101º, 150º.

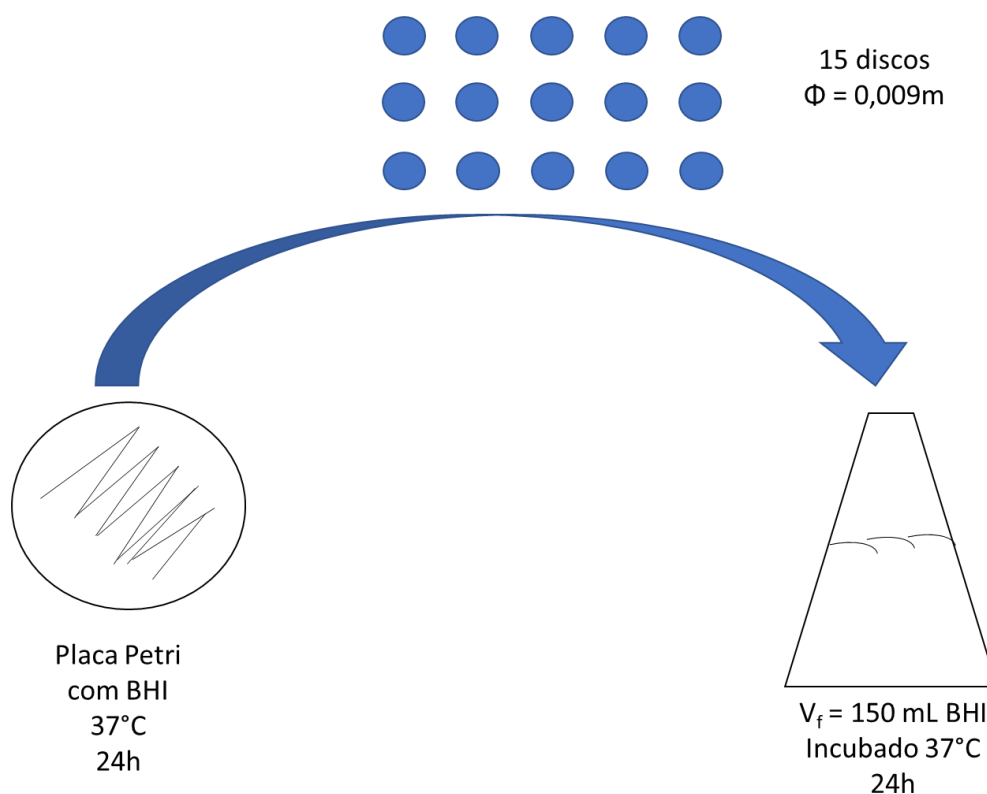
4.4. Reativação do Consórcio Microbiano facultativo (C)

Constituindo-se no terceiro pilar desta pesquisa, o consórcio de microrganismos facultativos, composto pelas cepas *Bacillus subtilis* e *Alcaligenes faecalis*, foi desenvolvido baseando-se na pesquisa realizada por Holanda (2016) e Mélo-Schlub *et al.* (2019).

No Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade Federal da Paraíba, foi realizada a reativação das cepas, através da inoculação, separadamente, de cada uma destas em placas de Petri contendo meio nutritivo sólido BHI (*Brain Heart Infusion* – Infusão Cérebro Coração), da marca Merck. Em seguida, as

placas de Petri com as cepas foram incubadas em estufa SPLabor à temperatura constante de 37°C por 24 horas. Após este período, com as colônias de microrganismos desenvolvidas, foram extraídos, destas colônias, 15 discos de $\Phi = 9$ mm da *Bacillus subtilis* (T-9) e *Alcaligenes faecalis* (T-19), e inseridos em dois erlenmeyers contendo, cada, 150 mL de meio BHI (*Brain Heart Infusion* – Infusão Cérebro Coração), reservados para cada uma das cepas. Realizada esta etapa, incubados novamente a 37°C, durante 24 h, obtiveram-se os meios com as cepas desenvolvidas, reunindo os meios em único Erlenmeyer, totalizando um volume final de 300 mL com a T-9 e T-19 (Figura 9) (PETERZ, 1991).

Figura 9 – Transferência dos discos do consórcio microbiano desenvolvidos nas placas de Petri para Erlenmeyers contendo meio líquido BHI. Na sequência, incubação em estufa, à T = 37°C por 24h.



Fonte: O autor (2022)

4.5. Delineamento Composto Central Rotacional DCCR – Planejamento Fatorial Experimental Composto Central, com triplicata no ponto central

Para execução do Planejamento DCCR, com triplicata no ponto central, esta pesquisa se embasou nos trabalhos desenvolvidos por Holanda (2016) e Mélo-

Schlub *et al.* (2019). Estes estudos indicaram que, para a codigestão anaeróbia de resíduos sólidos urbanos envelhecidos, a combinação de RSU (5 g), lodo de esgoto anaeróbio (25 mL) e consórcio microbiano facultativo (25 mL) apresentou os melhores resultados, em termos de biogás e metano gerados.

Considerando esta configuração de codigestão como foco nesta pesquisa, substituíram-se os resíduos sólidos urbanos envelhecidos e o lodo anaeróbio (Mélo-Schlub *et al.*, 2019) por resíduos sólidos hortifrutigranjeiros e digestato de biodigestor anaeróbio, mantendo-se o consórcio microbiano, porém realizando variações nas quantidades tanto do substrato, quanto dos inóculos.

A codigestão (5 g RO + 25 mL DG + 25 mL CM) consiste no experimento norteador da pesquisa. Este se localiza no nível zero, caracterizado pelo ponto central, sendo a única combinação realizada em triplicata (Exp. 9, 10 e 11).

A partir deste, esboçaram-se os pontos axiais positivo (+1,0) e negativo (-1,0), e os pontos máximo positivo (+1,41) e máximo negativo (-1,41), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Esquema experimental do Planejamento Fatorial DCCR – 2³.

Experimentos	Quantidade de Substrato	Massa de Substrato	Quantidade de inóculo	Volume de Inóculo
1	-1	3,0	-1	7,27 mL DG + 42,73 mL C
2	-1	3,0	+1	42,73 mL DG + 7,27 mL C
3	+1	7,0	-1	7,27 mL DG + 42,73 mL C
4	+1	7,0	+1	42,73 mL DG + 7,27 mL C
5	-1,41	2,18	0	25 mL DG + 25 mL C
6	+1,41	7,82	0	25 mL DG + 25 mL C
7	0	5,0	-1,41	50 mL C
8	0	5,0	+1,41	50 mL DG
9	0	5,0	0	25 mL DG + 25 mL C
10	0	5,0	0	25 mL DG + 25 mL C
11	0	5,0	0	25 mL DG + 25 mL C

Fonte: O autor (2021)

Tabela 2 – Esquema experimental do Planejamento Fatorial DCCR – 2³ com os pontos central e axiais.

Variáveis	-1,41	-1,0	0	+1,0	+1,41
Massa do substrato	2,18 g	3,0 g	5,0 g	7,0 g	7,82 g
Volume de Inóculo	50 mL C	7,27 mL DG + 42,73 mL C	25 mL DG + 25 mL C	42,73 mL DG + 7,27 mL C	50 mL DG

Fonte: O autor (2021)

Observando-se a Tabela 2, verifica-se que o nível zero apresenta uma quantidade intermediária de substrato (5 g) e uma proporção de inóculos 1:1 (25 mL de digestato e 25 mL de consórcio).

Quando se desloca para o primeiro nível axial positivo (+1,0) é verificada uma oscilação da quantidade de substrato, atingindo 7,0 g. Em relação aos inóculos, o digestato sofre uma variação positiva, aumentando ~ 1,71 vezes, chegando a 42,73 mL, cujo complemento para atingir o volume final de 50 mL, conforme metodologia realizada por Alves (2008), refere-se à quantidade de consórcio microbiano.

No segundo nível à direita, encontra-se o nível +1,41, no qual há descrita a quantidade de substrato de 7,82 g, bem como o volume de 50 mL de consórcio microbiano. Neste nível, não há presença do digestato.

Por outro lado, à esquerda do ponto central, há o primeiro nível axial negativo (-1,0), no qual é verificada uma oscilação do teor de substrato de 5,0 g para 3,0 g, bem como uma redução de ~ 29% no volume de digestato (7,27 mL, e um aumento de 58,51% no volume de consórcio (42,73 mL).

4.6. Montagem e realização do Ensaio do Potencial Bioquímico do Metano (*Biochemical Methane Potential*)

Baseando-se fundamentalmente no Planejamento Experimental Fatorial Composto Central, foram formuladas onze combinações entre os componentes, o substrato e os inóculos.

A fim de verificar a capacidade dos inóculos em degradar, e produzir o biogás e o metano do substrato, foi realizado o ensaio BMP. Tal ensaio, largamente adotado, desenvolvido e registrado pela literatura científica (Owen *et al.*, 1979;

Angelidaki *et al.*, 2004, 2009; Raposo *et al.*, 2011; Schirmer *et al.*, 2014; Hulsemann *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020; Santos Filho *et al.*, 2020) foi desenvolvido em biodigestores de pequena escala (volume de 250 mL), composto por um frasco de borossilicato, de boca rosqueada, com capacidade de 250 mL, cujo processo de rosqueamento permite a fixação de uma tampa de nylon ao frasco. À superfície localizada no topo desta tampa, encontra-se aderido, com o auxílio de vaselina sólida, um “o-ring” de silicone, o qual tem a função de impedir a livre passagem do gás produzido internamente (Figura 10).

Na superfície superior externa da tampa, são fixadas, por rosqueamento, duas projeções de tubulações, em latão, compostas por uma válvula tipo agulha, cada uma, sendo acoplado, por rosqueamento, na sua extremidade, um manômetro analógico de 0-1 kgf/cm², com intervalo de 0,02 kgf/cm².

Figura 10 - Biorreator, composto em borossilicato (garrafa), nylon (tampa) e latão (conexões), utilizado no ensaio BMP.



Fonte: SANTOS FILHO (2018)

No procedimento de montagem dos experimentos, os frascos de borossilicato foram pesados e tarados, utilizando-se, para isto, uma Balança Digital Marte AD 5000, e em seguida, pesadas as massas do substrato, inserindo-as nos frascos com o auxílio de uma espátula metálica de laboratório (Figura 11 a). Os inóculos, por sua vez, foram, previamente, agitados nos recipientes fechados que os acondicionaram, a fim de promover uma homogeneização na mistura, e em seguida, inseri-los em provetas graduadas de 100 mL, para, então, serem colocados nos frascos (Figura 11 b).

Inseridos os ingredientes de cada experimento nos respectivos frascos, envolveu-se a região rosqueada dos frascos com fita veda rosqueada, a fim de

se constituir um dos agentes de vedação. Juntamente a este, encontra-se outro componente de vedação, um anel “o-ring” de silicone, cujo diâmetro é proporcional ao diâmetro do gargalo (boca do frasco).

Na sequência, com o auxílio de um pHmetro Digimed DM-22, com eletrodo DME-CV4 específico para análise de pH, foi determinado o potencial hidrogeniônico de cada experimento e registrado em uma planilha impressa.

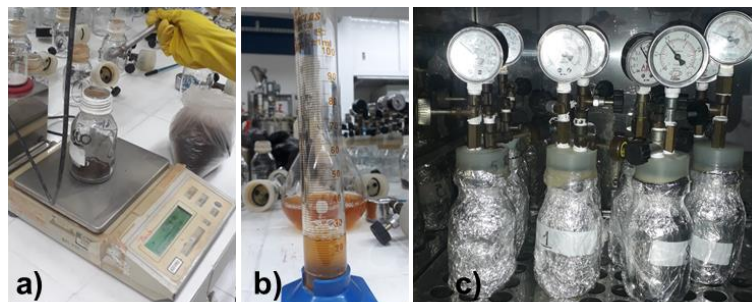
Subsequentemente, foi realizado o rosqueamento e a conexão da tampa ao biodigestor, estando a tampa sem o manômetro, e com as válvulas de entrada / saída de gases abertas. Assim, foi acoplada, em um dos segmentos de tubulação, uma mangueira de silicone conectada a um cilindro de gás nitrogênio (N_2), e realizada a purga do biorreator a uma vazão $Q \approx 1$ L/h, durante 2 minutos, realizando uma leve agitação do frasco, em movimento circular.

Concluído este período, foi vedada a válvula de saída do gás, e posteriormente, vedada a válvula de registro de pressão interna, permitindo assim, o estabelecimento da atmosfera anaeróbia no interior do biorreator.

Por fim, conecta-se o manômetro analógico de capacidade de 1 kgf/cm^2 , com intervalo de $0,02 \text{ kgf/cm}^2$, e abre-se a válvula de registro de pressão, aliviando a pressão até o limite mínimo de $0,15 \text{ kgf/cm}^2$. Envolve-se o frasco do biorreator com uma folha de alumínio, inserindo, em seguida, uma etiqueta para identificação (com numeração e composição da biomassa existente), recobrimdo-os, posteriormente, com plástico filme, visando a proporcionar aderência da folha de alumínio ao frasco do biorreator. Tal procedimento objetiva evitar a interferência de agentes externos ao processo bioquímico existente no seu interior. As pressões dos frascos foram registradas em uma prancheta, e posteriormente, lançadas em uma planilha elaborada no MS Excel 2010.

Os frascos foram, então, inseridos em uma estufa de secagem e esterilização, à temperatura constante de 37°C , durante 68 dias (Figura 11 c).

Figura 11 – Procedimento de montagem do ensaio BMP: (a) pesagem do substrato; (b) quantificação do volume de consórcio microbiano; (c) incubação e monitoramento dos biorreatores em estufa.



Fonte: O autor (2021)

4.6.1. Monitoramento diário e Tratamento dos dados obtidos no ensaio BMP

No início do procedimento, o ensaio BMP necessita de monitoramento diário dos biorreatores, consistindo, esta primeira parte, do registro de data e horário da verificação da pressão, bem como da leitura da pressão interna em cada frasco, no intervalo de 0-1,0 (0,02) kgf/cm².

Paralelamente ao monitoramento, há, preexistente, desenvolvida no software Excel 2010, uma planilha na qual são lançados os seguintes dados:

- 1) Volume total do biorreator: a capacidade total do biorreator;
- 2) Volume líquido no frasco: volume ocupado pelas substâncias inseridas no biorreator;
- 3) Data (coluna A): os dias de realização do monitoramento;
- 4) Hora (coluna B): o horário de início da atividade de monitoramento;
- 5) Dias corridos (coluna C): os dias contados, em números arábicos;
- 6) Leitura da pressão do frasco (coluna D): valor indicado pelo ponteiro do manômetro de cada biorreator;
- 7) Diferença de pressão (coluna E): consiste na pressão diferencial infinitesimal resultante da diferença entre o dia atual e dia imediatamente anterior, ou seja, $p_{(n+1)} - p_{(n)} = \Delta p$, dado em kgf/cm²;
- 8) Conversão da pressão (coluna F): consiste na operação matemática de conversão de kgf/cm² para mbar, na qual multiplica-se o valor da pressão do frasco do dia atual por 980,65;

- 9) Pressão atmosférica (mbar) (coluna G): para identificar os dados de pressão atmosférica para o referido horário do monitoramento, é preciso fazer uso de dados meteorológicos, cujo procedimento é descrito a seguir:

Com o conhecimento da data e do horário do monitoramento, obtém-se a pressão atmosférica para aquele horário através da página do Instituto Nacional de Meteorologia (www.inmet.gov.br), obedecendo à seguinte sequência: (1) Observações; (2) Estações automáticas; (3) “Recife”; (4) Dados; (5) Inserir as datas; (6) Identificar a hora mais próxima do horário do ensaio, fazendo-se a média entre os valores máximo e mínimo, em hPa.

É importante salientar que o INMET apresenta a hora em UTC (horário de Brasília + 3h), sendo necessário adicionar 3h ao horário do ensaio, para se obter a pressão atmosférica aproximada, correspondente ao horário do ensaio.

- 10) Leitura temperatura (coluna H): significa o valor da temperatura, em graus celsius, à qual estão submetidos os biorreatores;
- 11) Conversão de temperatura (coluna I): consiste na operação matemática de conversão de temperatura de °C para °K, na qual soma-se 273,15 ao valor em °C;
- 12) Gerado entre t e t+1 (mL) (coluna J): consiste no volume gerado no intervalo de, aproximadamente, 24h, através da Equação 02:

$$\frac{p(\text{mbar}) \times V(\text{headspace}) \times 22,41 \times 1000}{83,14 \times t (^{\circ}\text{K})} \quad \text{Eq. 02}$$

- 13) Acumulado (mL) (coluna K): consiste na adição de um incremento de gás (ΔV), produzido no intervalo de 24h, ao volume inicial (V_0), ou seja, $V_1 = V_0 + \Delta V$;
- 14) Condições CNTP gerado (mL) (coluna L): refere-se ao incremento de volume (ΔV) ocorrido no intervalo de 24h, entre t_1 e t_0 , durante todo o período de monitoramento, sob condições normais de temperatura e pressão (CNTP), dada pela Equação 03:

$$\frac{\Delta V(\text{mL}) \times (273/T(^{\circ}\text{K})) \times (p_{\text{atm}}(\text{mbar}) - 42)}{760} \quad \text{Eq. 03}$$

- 15) Condições CNTP acumulado (mL): refere-se à adição, sob condições normais de temperatura e pressão (CNTP), de vários incrementos (acúmulo de ΔV) ao volume inicial (V_0), referente aos dias subsequentes (por exemplo, $V_0 + \Delta V_1 = V_1$), até atingir um valor acumulado final (por exemplo, $V_n = V_0 + \Delta V_n$), cujo cálculo é realizado através da Equação 04:

$$\frac{(V_0 + \Delta V_1)(\text{mL}) \times (273/T(^{\circ}\text{K})) \times (\text{patm}(\text{mbar}) - 42)}{760} \quad \text{Eq. 04}$$

- 16) Cálculo – Taxa geração (mL/dia) (coluna N) – Método 1: refere-se ao cálculo da razão entre a geração acumulada de biogás CNTP e o número de dias corridos do início da incubação dos biorreatores, conforme a Equação 05:

$$\frac{(V_0 + \Delta V_1)(\text{mL})}{n^{\circ} \text{ dias}} \quad \text{Eq. 05}$$

- 17) Peso Bruto Unitário (P.B.U.) inicial (g) (coluna P): refere-se ao peso do biorreator antes do alívio do volume excedente de biogás;
- 18) Peso Bruto Unitário (P.B.U.) final (g) (coluna Q): refere-se ao peso do biorreator após o alívio do volume excedente de biogás;
- 19) Massa do biogás existente no “headspace” (g): consiste no resultado do cálculo da diferença entre P.B.U. inicial e o P.B.U. final.

4.6.2. Método e procedimento de análise quantitativa do biogás produzido

Com o intuito de analisar os percentuais de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) presentes nas amostras de biogás obtidas durante a fermentação anaeróbia, utilizou-se o Cromatógrafo Gasoso APPA GOLD TCD/FID, cujo gás de arraste, coluna cromatográfica e detector utilizados foram, respectivamente, o hidrogênio (H_2), a empacotada Porapak N 2,5 m e diâmetro de 3/16” e o detector de condutividade térmica, atuando, estes dois acessórios (coluna e detector), sob temperaturas de 60°C e 150°C, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2018; SANTOS FILHO *et al.*, 2020).

Previamente à injeção das amostras de biogás contidas nos biorreatores, foi feita a calibração do equipamento, injetando-se uma amostra padrão do biogás, cujas concentrações dos principais elementos componentes do biogás são conhecidas como 55% v/v do gás metano (CH_4) e 45% v/v do dióxido de carbono

(CO₂), a fim de identificar o intervalo de valores referentes à variação dos T_R (tempos de retenção dos picos) e às áreas de base das curvas dos dois componentes, os quais são apresentados nos cromatogramas.

Na etapa de injeção das amostras de biogás, foi utilizada uma seringa de 1 mL, para a coleta e a inserção do gás no injetor, pressionando, na sequência, o botão “start”, existente no controle de acionamento remoto do equipamento analítico. No procedimento de análise das amostras, foram realizadas três injeções de biogás, sendo assim em triplicata.

As análises de biogás em cada biorreator, para a identificação das concentrações de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), foram realizadas fazendo-se uso do Sistema de Aquisição de Dados Cromatográficos N2000 Chromatostation.

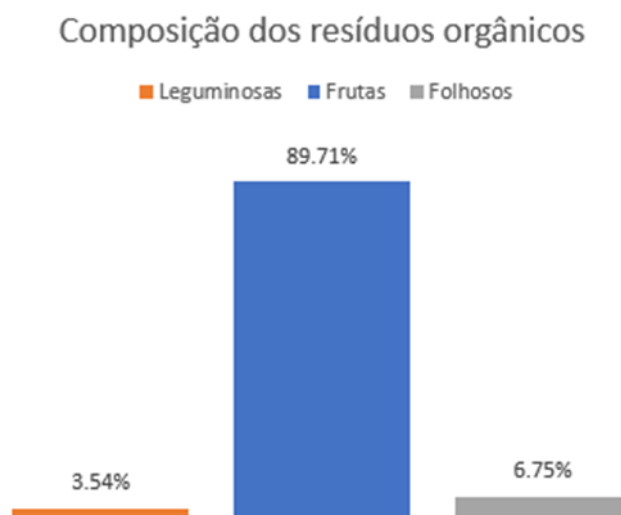
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resíduos hortifrutigranjeiros

5.1.1 Composição dos resíduos hortifrutigranjeiros

Realizada a composição gravimétrica dos resíduos hortifrutigranjeiros, verificou-se a predominância de frutas, englobando um percentual de 89,71%, sendo seguida pelos folhosos, com 6,75%, e leguminosas, com 3,54% (Figura 12). Tais resultados estão em concordância com os obtidos por Clercq *et al.* (2017), Zhao *et al.* (2019) e Beniche *et al.* (2020), os quais apontam que grandes quantidades de frutas refletem em altos níveis substratos orgânicos, como carboidratos, proteínas e lipídeos, tornando-os passíveis de biodegradação.

Figura 12 – Quantificação percentual de resíduos hortifrutigranjeiros utilizados como substrato.



Fonte: O autor (2022)

Em seu trabalho, pesquisando a biodegradabilidade anaeróbia de resíduos de alimentos oriundos de restaurantes localizados em Rennes (França), Fisgativa *et al.* (2017) segregaram 15 kg destes resíduos nas tipologias: papel (guardanapos e toalhas de papel), vegetais (cozidos e não cozidos), frutas (cascas e porções não consumidas), comida amilácea (pão, arroz, massa, entre outros), comida à base de carne (incluindo carne vermelha, aves, peixe etc.) e outros (ossos, molhos, produtos de laticínios).

Cada categoria tipológica contribuiu diferentemente para o teor de sólidos voláteis global do processo. Os resíduos de restaurantes apresentaram teor de

SV de 54,5 g*kgWW⁻¹ (WW – massa úmida), apresentando um potencial de biometano de 87,6 NLCH₄*kgSV⁻¹ (FISGATIVA *et al.*, 2017).

5.1.2 Análises físico-químicas dos resíduos

A fim de ter um conhecimento mais detalhado a respeito do substrato, com vistas ao seu aproveitamento ótimo, através da tecnologia da digestão anaeróbia, foram realizadas, no mesmo, algumas análises físico-químicas, conforme expostas na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados da determinação de parâmetros físico-químicas referentes ao substrato.

Parâmetros	Substrato
Umidade (%)	85,56
pH (20°C)	3,5
SV (g.g ⁻¹ ST)	0,93
DBO (g/L)	250
DQO (g/L)	267,11
DBO/DQO	0,936
C (g.g ⁻¹)	0,18
N (g.g ⁻¹)	0,015
C/N	12

Fonte: O autor (2021)

Observando-se os resultados da Tabela 3, verifica-se um elevado percentual de umidade de 85,56%, que é característico de resíduos orgânicos, sobretudo hortifrutigranjeiros (USEPA, 1991). Xiao *et al.* (2013) e Lin *et al.* (2013) citados por Beniche *et al.* (2020) relataram que resíduos orgânicos apresentam teores de umidade superiores a 70%.

Santos Filho *et al.* (2020), trabalhando com resíduo hortifrutigranjeiros da Ceasa-PE, obtiveram 78,5% de umidade. Isto ocorre devido à alta fração de água constituinte de cada material presente nestes tipos de resíduos. De acordo com a USEPA (1991), sistemas de fermentação anaeróbia, com umidades de 60-90% contribuem fortemente para a formação, potencializando a geração de biogás.

O potencial hidrogeniônico do substrato, por sua vez, apontou para um tipo bastante ácido, o qual demandou um maior cuidado para evitar a ocorrência de uma sobrecarga orgânica da biodigestão. Tal valor de pH de 3,5 encontra-se um pouco abaixo do intervalo de atuação das bactérias hidrolíticas, que abrange de 4,0 a 11,0, segundo Zhang *et al.* (2009) mencionados por Phan Van *et al.* (2020).

Tais características expostas pelo pH, sólidos voláteis totais e relação DBO/DQO, respectivamente, 3,5, 0,93 gSV.g⁻¹ST, 0,936, são indicativos de que se trata de um substrato bastante orgânico, com compostos complexos, o que pode levar ao processo de inibição da digestão anaeróbia.

Oliveira *et al.* (2021), caracterizando resíduos de alimentos para codigestão com lodo de esgoto doméstico, encontraram valores de umidade, sólidos voláteis e relação C/N muito próximos aos obtidos por este trabalho, os quais foram 85,45%, 0,94 e 13,20, respectivamente. Tais dados são característicos de substrato com elevado potencial orgânico e energético, porém, por ter baixo teor de C/N, tal substrato pode contribuir para o aumento da quantidade de compostos nitrogenados no meio, sobretudo a amônia (NH₃), a qual é apontada como um dos grandes agentes inibidores do processo de digestão anaeróbia (CHEN *et al.*, 2008; MOROZOVA *et al.*, 2020).

Yadvika *et al.* (2004) e Steinmetz *et al.* (2016) entre outros autores mencionam que a faixa ideal da razão C/N para a ocorrência de uma plena fermentação anaeróbia encontra-se entre 25 e 30.

Estes resíduos orgânicos, cuja elevada carga orgânica favorece à produção de ácidos graxos voláteis (AGV) (SUKPHUR *et al.*, 2021), contribuem efetivamente para a redução do pH ambiente, tornando-se necessária a adição de um inóculo ao sistema, a fim de reduzir, minimizar, ou até mesmo, anular o potencial inibidor do substrato utilizado. Ou seja, este pode se tornar um potencial agente alcalinizante do sistema fermentativo.

5.2. Uso do digestato oriundo de biodigestor anaeróbio como potencial inóculo

Característico do processo de autodepuração da matéria orgânica, a redução da carga orgânica, em termos de DQO e sólidos voláteis, com a

consequente elevação do pH, é fator contribuinte da fermentação anaeróbia. Elbeshbishy *et al.* (2012) citados por Rajput & Sheikh (2019) mencionam o potencial que os digestatos de plantas de biodigestão anaeróbia podem apresentar como inóculos.

Em seu estudo, Elbeshbishy *et al.* (2012) aclimataram três inóculos visando à realização da biodigestão, sendo dois oriundos de plantas de tratamento de esgotos urbanos e um de digestor de resíduos orgânicos, durante 40 dias. Tais autores verificaram e confirmaram a elevada biodegradabilidade do efluente de resíduos orgânicos, assim como da DQO residual. Com uma produção diária inicial de 34 mLCH₄/gSV.d e uma produção acumulada de metano de, aproximadamente, 800 mLCH₄, foi necessário o período de aclimação (t = 40 dias) dos inóculos, a fim de condicioná-los e adequá-los à fermentação anaeróbia.

O período de aclimação realizado neste estudo condicionou-se à redução dos valores de DQO, DBO, SV e o aumento do pH, para determinar o momento da sua utilização, que levou 150 dias.

Rajput & Sheikh (2019) realizaram a digestão anaeróbia com três inóculos (esterco digerido, lodo de tanque séptico e lodo aclimatado), e com dois substratos (farinha de girassol e palha de trigo). O lodo aclimatado contribuiu positivamente para a produção de biogás da codigestão “farinha de girassol + Lodo aclimatado”, que atingiu 691 NmL_{biogás}/gSV, sendo a segunda maior produção de biogás do experimento. Ao TDH = 29 dias, identificou-se o ponto de bioestabilização desta codigestão. Isto mostra o quanto o processo de aclimação pode contribuir para otimizar, amplamente, o processo de fermentativo anaeróbio.

Díaz-Barajas *et al.* (2021) estudaram a influência da biodigestão de um inóculo (lodo de ETE) previamente ativado, sobre uma biomassa previamente aclimatada (vinhaça). Durante as primeiras duas fases da aclimação, com concentrações de vinhaça de 7 e 15%, não foi detectada nenhuma produção de biogás. Já quando adicionaram percentuais de 45, 55, 65 e 75% de vinhaça à fermentação, foram observados resultados bastante positivos, em um tempo de detenção hidráulica de 4 dias, de 130 NmL/L a 500 NmL/L. No que tange à

geração diária de biogás, é necessário destacar a codigestão de “Lodo ETE + 65%”, a qual no 1º dia de fermentação apresentou 300 NmL/L, ocorrendo, no 4º dia uma redução de 91,67%, atingindo 25 NmL/L.

Este estudo de Díaz-Barajas *et al.* (2021) aponta que o processo de aclimação/incubação da biomassa, ou às vezes, do inóculo, com tempos de retenção hidráulica (HRT) que podem variar de 8 dias a semanas (em torno de 6 semanas), pode contribuir positivamente para o desempenho da biodigestão de forma global. Tais pesquisadores destacam, ainda, a considerável redução de carga orgânica, em termos de DQO, de 22,73%, atingindo, ao final da fermentação bioquímica, 17.000 mg/L de carga orgânica.

Hu *et al.* (2020) estudaram o desempenho da geração de biogás de resíduos orgânicos com diferentes concentrações de sódio (Na^+) e de inóculos. Foram eles: Reator R1: Resíduo orgânico com 5 g/L Na^+ + Lodo bruto ETE, R2: Resíduo orgânico com 5 g/L Na^+ + Lodo aclimatado ETE, R3: Resíduo orgânico com 2 g/L Na^+ + Lodo aclimatado ETE. Durante um período de detenção hidráulica de 20 teste BMP, os pesquisadores constataram um desempenho dos inóculos aclimatados, no tocante ao potencial de geração de metano, cujo R3: Resíduo orgânico (2 g/L Na^+) + Lodo aclimatado, atingiu 90 NmL/gSV, e o R2: Resíduo orgânico (5 g/L Na^+) + Lodo aclimatado, alcançou 75 NmL/gSV, sendo o inóculo bruto, isento de aclimação, o resultado menos interessante.

Todos estes autores evidenciam a importância da realização do processo de aclimação do inóculo como fator preponderante para o sucesso da fermentação anaeróbia. Hu *et al.* (2020) demonstra, detalhadamente, a ocorrência do fenômeno de autodepuração da carga orgânica, realizada pelo próprio inóculo, durante um período de detenção hidráulica de 15 dias, logo após o sistema receber uma alimentação com resíduos orgânicos, com elevado teor de sódio.

Conforme esboçado na Metodologia desta pesquisa, o ensaio do Potencial Bioquímico do Metano baseou-se, fundamentalmente, no Planejamento Experimental, denominado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), visando explorar suas características, desenvolvendo, desta forma, uma

superfície de resposta gerada a partir de uma função polinomial de segunda ordem.

Este delineamento composto central é o mais comumente delineamento fatorial fracionado usado no modelo de superfície de resposta (BHATTACHARYA *et al.*, 2021).

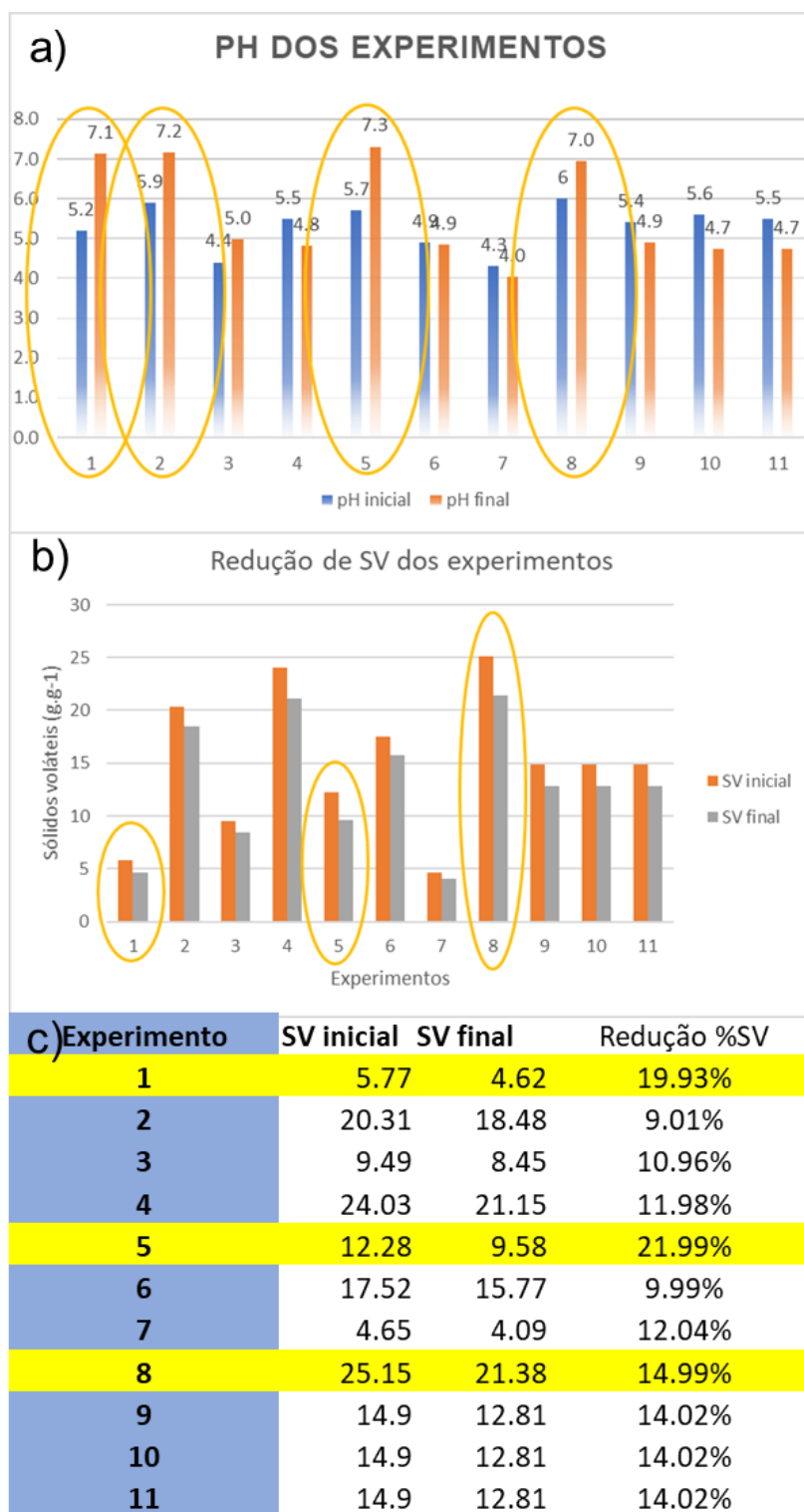
De acordo com Fleck *et al.* (2017), este delineamento é formado por um esquema fatorial de tratamento (2^3), com dois pontos fatoriais, três axiais, e três centrais, totalizando onze experimentos.

A adoção deste tipo de delineamento é fundada nas seguintes vantagens: 1) É a extensão do projeto fatorial de dois níveis; 2) Para estimar a não-linearidade das respostas no conjunto de dados fornecido; 3) Ajuda a estimar a curva na resposta contínua obtida; 4) Máximo de informações em um ensaio experimental mínimo; 5) Redução no número de ensaios necessários para estimar os termos quadrados no modelo de segunda ordem; 6) Têm sido amplamente utilizados em resposta à modelagem de superfície e otimização (BHATTACHARYA *et al.*, 2021).

5.3.Determinação do Potencial hidrogeniônico e de sólidos voláteis dos biodigestores BMP

A fim monitorar os principais parâmetros e identificar possíveis instabilidades e inibições da digestão anaeróbia, foram realizadas, nos momentos inicial e final do ensaio BMP, determinações de pH e carga orgânica, conforme já mencionado e detalhado na Metodologia. Tais dados estão expostos na Figura 13.

Figura 13 – a) Valores iniciais (pré-biodigestão) e finais (pós-biodigestão) do pH dos experimentos; b e c) Redução dos teores de sólidos voláteis dos experimentos.



Fonte: O autor (2021)

Analisando, de forma detalhada, os potenciais hidrogeniônicos dos experimentos e as reduções dos teores de sólidos voláteis (Figura 13 a, b e c),

observa-se, de imediato, que as reduções mais acentuadas ocorreram nos Experimentos 1 e 5, sobretudo, por terem recebido as menores quantidades de matéria orgânica, em estado sólido, em termo de sólidos “secos”, como também os sólidos suspensos e sedimentáveis, presentes no digestato. O gráfico do pH (Figura 13 a) dos experimentos é a prova contundente que expõe o sucesso e o fracasso deles.

Seguindo neste raciocínio, é possível verificar que os Experimentos 9, 10 e 11, notadamente a triplicata no ponto central, que continham apenas 25 mL DG com 5 g RO e 25 mL C, apresentou uma baixa capacidade de tamponamento, e, devido a isso, desenvolveu o processo de acidificação (CHEN *et al.*, 2008; DAREIOTI *et al.*, 2021).

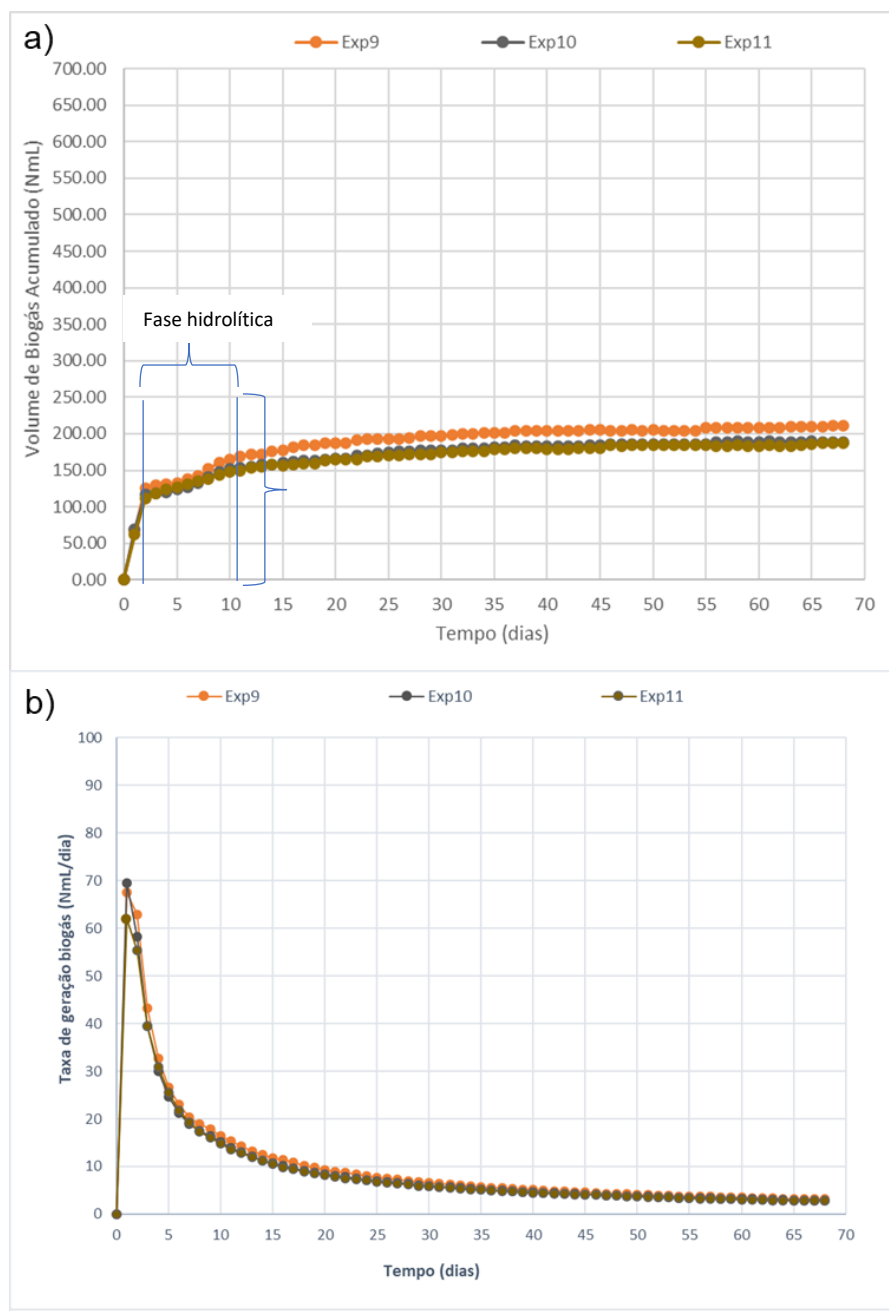
Os Experimentos 6 e 7, que contiveram grandes quantidades de massa de substrato, também não evoluíram satisfatoriamente na fermentação anaeróbia.

5.4. Geração Acumulada e Taxa de Geração de Biogás dos biodigestores BMP

Constituindo-se no pilar do Planejamento Experimental, o ponto central, representado pela configuração “5g RO + 25mL DG + 25mL C” foi o único experimento a ser realizado em triplicata, sendo denominados “Exp 9”, “Exp 10” e “Exp 11”.

Os referidos experimentos apresentaram Volumes de Biogás Acumulado de 211,26 NmL, 189,39 NmL e 186,96 NmL, no 68º dia de fermentação, respectivamente, conforme observado na Figura 14.

Figura 14 – a) Volumes de Biogás Acumulados e b) Taxas de Geração referentes aos experimentos 9, 10 e 11 (ponto central).



Fonte: O autor (2021)

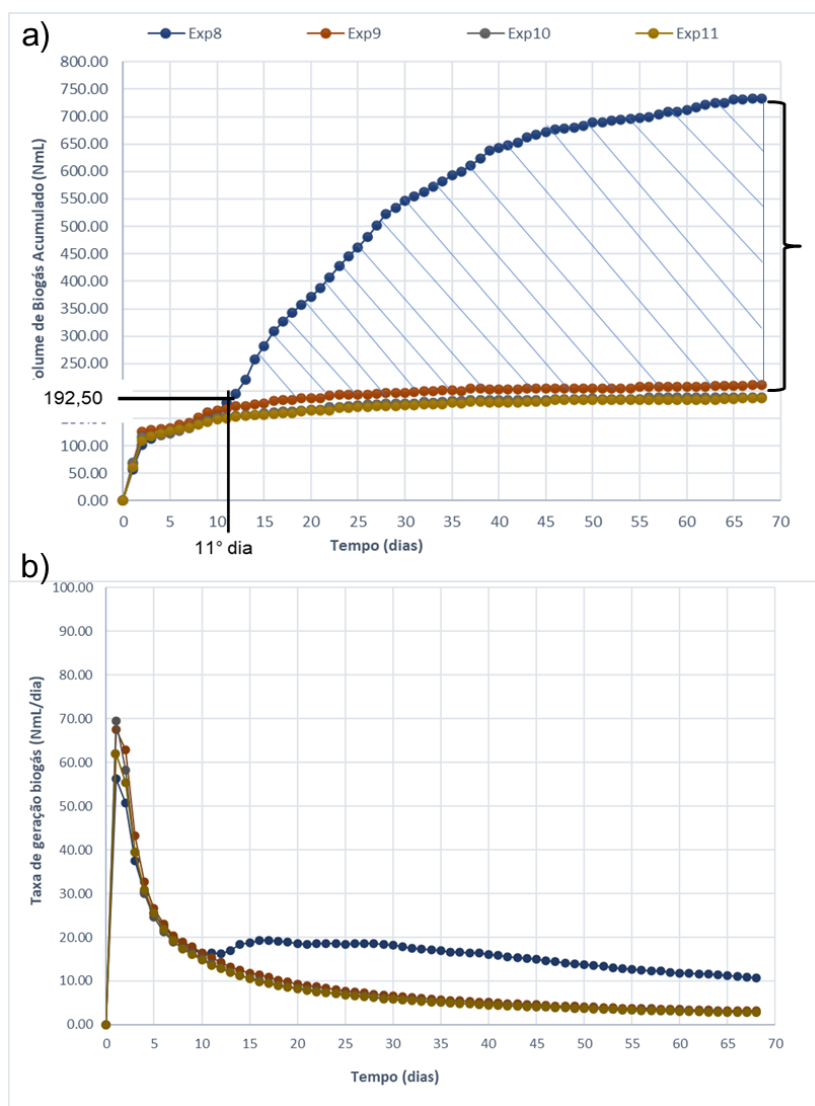
Diante do exposto nas Figuras 14 (a) e (b), em ambas, verificam-se tanto uma linearidade, quanto uma coerência entre os três experimentos, uma vez que estes possuem exatamente a mesma configuração. Na Figura 14 (a), eles se mostram idênticos, sobretudo, nos dois primeiros dias, onde atingem 129,44 NmL, 116,39 NmL e 110,76 NmL, os experimentos Exp. 9, Exp. 11 e Exp. 10, respectivamente. Verifica-se, além disso, que foram necessários apenas dois dias para que 60% da geração global do biogás do experimento. Assim sendo,

é possível afirmar que, em termos operacionais, a ocorrência da biodigestão de forma majoritária nos primeiros dez dias, pois contabilizaram-se 168,42 NmL, para o Exp. 9, representando 78% do volume global.

É possível verificar que a utilização de 5 g de substrato provocou, ao processo biodegradativo, uma sobrecarga orgânica, inibindo o sistema de atingir o ponto ótimo da fermentação.

A partir deste ponto central, foi possível verificar o desempenho de outras configurações, onde se manteve invariável a quantidade de substrato (5 g), alterando-se o volume de inóculo (50 mL DG), conforme observado na Figura 15.

Figura 15 – Volume Acumulado de Biogás dos experimentos 8, 9, 10 e 11, sendo os três últimos a triplicata no ponto central.



Fonte: O autor (2021)

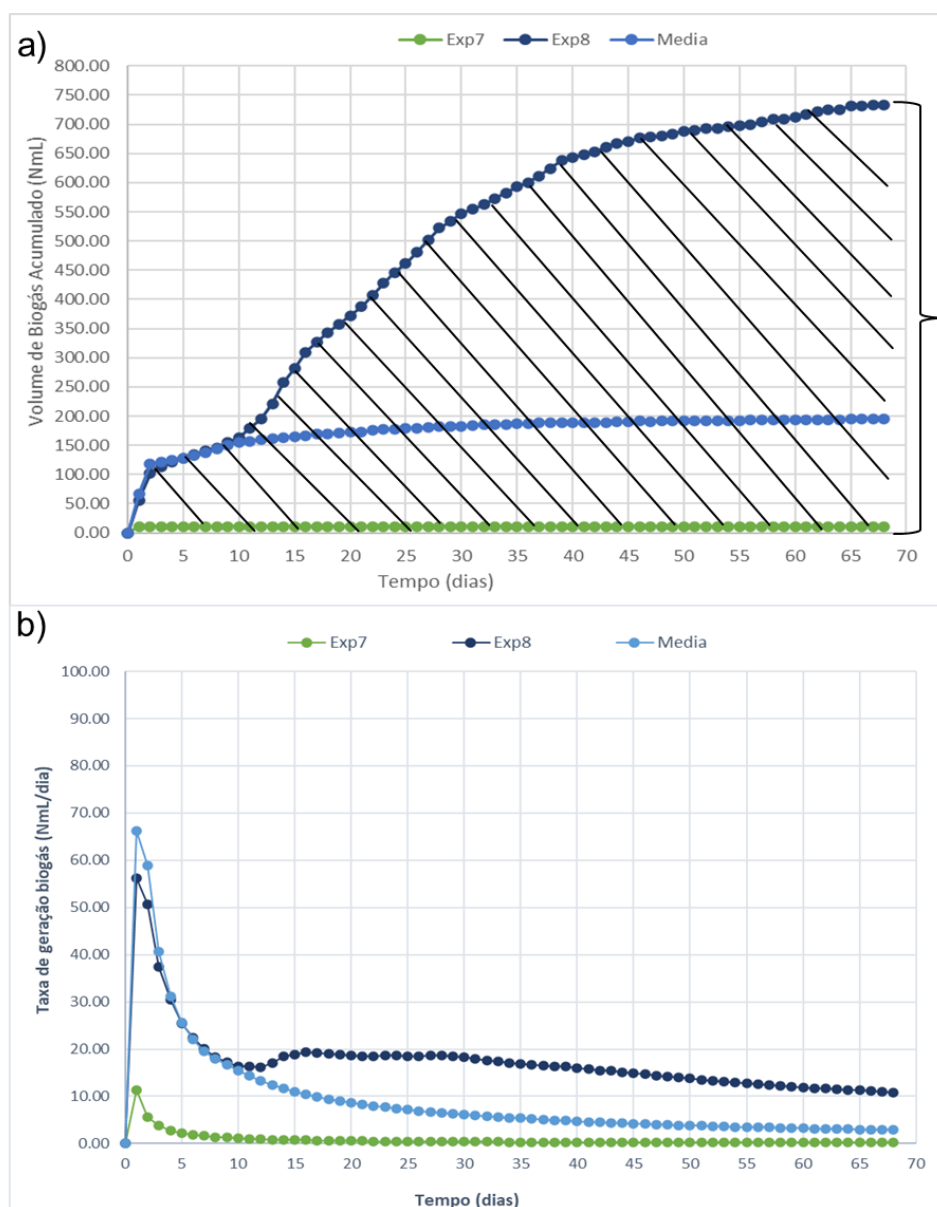
Na Figura 15 a, verifica-se, que, nos dois primeiros dias, há uma rápida geração de biogás, atingindo, aproximadamente, 120 NmL, ocorrendo, nos dias subsequentes, uma inflexão da curva de geração de biogás, tendendo a uma estabilização. Conforme destacado, no 11º dia, ocorre um deslocamento entre os gráficos da triplicata no ponto central e o Experimento 8, no qual o Experimento 8 reassume um comportamento crescente na produção de biogás, alcançando, no 39º dia de fermentação, o percentual de 87% do total de biogás gerado no ensaio BMP.

Os Experimentos 9, 10 e 11 permaneceram com uma tendência de estabilização, produzindo uma quantidade mínima diária de biogás. Tal comportamento se deveu, sobretudo, ao processo de acidificação do sistema biodegradativo, o que inibiu a fermentação anaeróbia.

Por sua vez, o Experimento 8 manteve a quantidade de substrato (5 g) dos Experimentos 9, 10 e 11, porém, dobrando, a quantidade do digestato, chegando a 50 mL, e eliminando o consórcio microbiano do processo bioquímico. O aumento do volume de digestato promove o aumento do pH do sistema, assim como da flora microbiana, uma vez que ele havia sido previamente aclimatado, visando tornar-se um agente tamponante.

A elevação do pH do sistema contribuiu consideravelmente para o sucesso no desenvolvimento do sistema anaeróbio, conforme mencionado por Holliger *et al.* (2016) e Cerón-Vivas *et al.* (2019).

Figura 16 – Volume Acumulado de Biogás entre os Experimentos 7, 8 e a média da triplicata no ponto central (9, 10 e 11).



Fonte: O autor (2021)

As Figuras 16 a e 16 b expõem, ainda, que, entre o 3° e o 8° dia de fermentação, especificamente no Experimento 8, ocorre uma redução considerável da taxa de geração diária de biogás, o que pode ser explicada pela paulatina, porém gradual degradação da matéria orgânica complexa, formada por compostos carbonáceos de altos pesos moleculares, que retarda a ação enzimática realizada pelos microrganismos existentes, sobretudo, nas primeiras etapas da digestão anaeróbia (PANIGRAHI & DUBEY, 2019; MENZEL *et al.*, 2020).

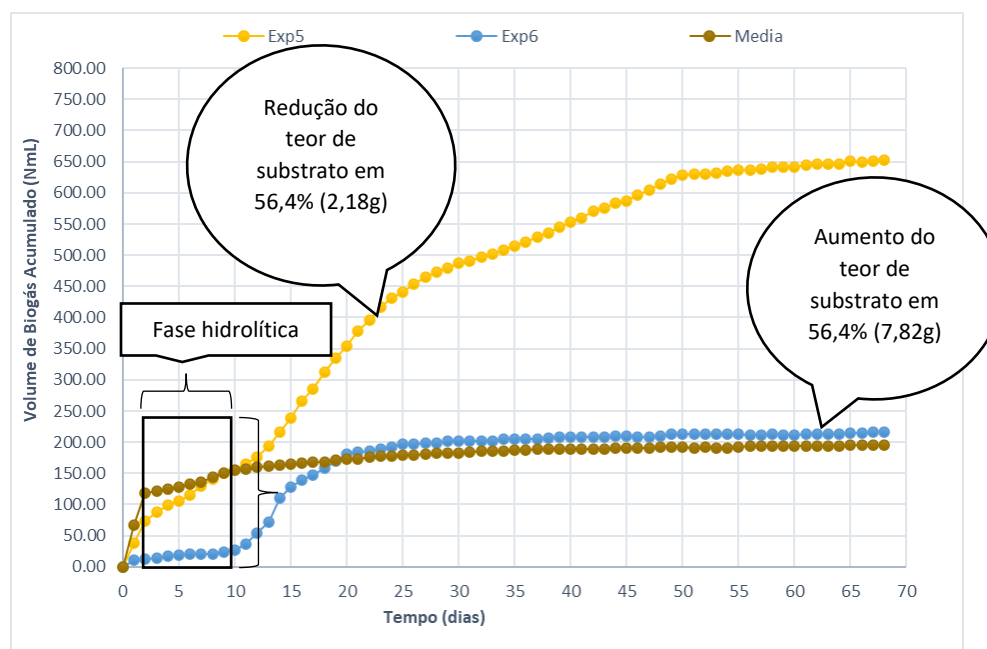
Logo em seguida, posterior à etapa complexa da hidrólise / acidogênese, verificou-se uma elevação da taxa de geração diária de biogás, tendo em vista a grande quantidade de substâncias de simples decomposição e fácil assimilação pelos microrganismos (NORAINI *et al.*, 2017; MENZEL *et al.*, 2020).

O Experimento 7, por sua vez, apresentou um desempenho irrisório ante o Experimento 8. Possíveis fatores para a ocorrência de inibição da geração de biogás são: o pH baixo e a carga orgânica alta, em termos de DQO. Neste Experimento, observou-se a completa inibição da geração de biogás (LE PERA *et al.*, 2021).

5.5. Produção de Acumulada de Biogás em função da variação da quantidade de substrato

Na Figura 17, são verificados os desempenhos da Geração de Biogás dos Experimentos 9, 10 e 11 (triplicatas no ponto central), bem como os Experimentos 5 e 6.

Figura 17 – Desempenho da Geração Acumulada de Biogás dos Experimentos 5, 6 e a média da triplicata no ponto central (Experimentos 9, 10, 11).



Fonte: O autor (2021)

Tomando-se como base o comportamento da média triplicata no ponto central, foram desenvolvidas as configurações dos Experimentos 5 e 6. A primeira possuiu uma quantidade de substrato 56,4% inferior à contida no ponto

central. Assim sendo, o Experimento 5 apresentou uma quantidade de substrato de 2,18 g de resíduo orgânico adicionadas aos 25 mL_{LDG} + 25 mL_{LC}, correspondendo, desta forma, a uma razão substrato / inóculo de 1:23. A redução do teor de substrato está inteiramente relacionada à menor carga orgânica existente no Experimento 5. Assim sendo, tal configuração, com menor carga orgânica, permite uma maior degradabilidade de seus compostos orgânicos, uma vez que o pH do sistema contribui efetivamente para o desenvolvimento da fermentação. Esta configuração atingiu, no 68º dia de TDH, a marca de 652,43 NmL de geração acumulada de biogás.

Por outro lado, o Experimento 6, constituído por “7,82 g + 25 mL_{LDG} + 25 mL_{LC}”, apresenta o maior teor de substrato presente na referida pesquisa. Tal fator é apontado como a principal causa de instabilidades e colapsos em fermentadores de plantas de digestão anaeróbia (MEEGODA *et al.*, 2018; JANESCH *et al.*, 2021; ELLACURIAGA *et al.*, 2021). É possível verificar, ainda, um intervalo de tempo caracterizado pela baixa produção de biogás (principalmente, referente aos Experimentos 6 e a Média (9, 10 e 11)). Estas características são atribuídas à fase hidrolítica, na qual, devido à grande quantidade de substâncias complexas em processos bioquímicos de degradação, ocorrem instabilidades nos parâmetros que regem a digestão anaeróbia (MENZEL *et al.*, 2020).

No comparativo da relação substrato / inóculo, observa-se o quanto ele influencia na fermentação anaeróbia, uma vez que, entre os Experimentos 5 e 6, ocorre um aumento na quantidade de substrato de, aproximadamente, 3,6 vezes, o que reflete diretamente na variação dos mais diversos fatores que governam o tratamento anaeróbio (AKYOL, 2020). De acordo com este autor, a relação substrato / inóculo consiste num parâmetro crítico para fermentação, sobretudo no início do biodigestor de biogás, uma vez que eles afetam diretamente a estabilidade e desempenho do sistema (MA *et al.*, 2019).

Diante disso, Dixon *et al.* (2019) mencionam o quão importante e fundamental é a seleção de uma relação substrato / inóculo, visando prevenir (ou evitar) o acúmulo de ácidos orgânicos (ex.: ácidos graxos voláteis) e a acidificação do meio, buscando alcançar o rendimento máximo de metano.

Dixon *et al.* (2019), analisando a geração de biometano da biodigestão entre lodo primário ativado e resíduos orgânicos (alimentares e jardinagem), nas seguintes proporções de substrato / inóculo: 1,0, 2,0 3,0.

Dixon *et al.* (2019) expõem, em seus resultados, que os maiores valores de rendimento e taxa de metano produzido foram obtidos na proporção S / I = 1,0 g ST substrato / g ST inóculo, os quais foram, respectivamente, 2.400 mL de metano acumulado, e 130 mL CH₄ / g SV, em um TDH de 48 dias.

Os principais aspectos que devem ser destacados referentes a esta pesquisa de Dixon *et al.* (2019) referem-se aos dados de pH, alcalinidade e ácidos graxos voláteis, os quais são de grande importância para o bom funcionamento de qualquer sistema de biodigestão.

Estes pesquisadores verificaram que, à medida que aumentaram a proporção substrato / inóculo, foram observadas reduções no pH, na alcalinidade, nos ácidos graxos voláteis, na geração acumulada e no rendimento acumulado de metano. As proporções S / I = 1,0 g, 2,0 g e 3,0 g ST substrato / g ST inóculo apresentaram reduções de 63,85% no pH, atingindo um pH final de 5,5; de 47,80% na alcalinidade final, atingindo 4,7 g CaCO₃ / L; de 88,09% no teor de AGV, atingindo 0,05 g HAc / L; um aumento na produção acumulada de metano de 94%, atingindo 2.500 mL, no S / I = 1; e um aumento no rendimento de metano de 92,85%, atingindo 140 mL CH₄ / g SV.

O referido estudo relatou e evidenciou o quão a variação da relação substrato / inóculo pode ser benéfica ou limitante do processo de digestão anaeróbia. Além disso, expôs, também, que é crucial ter o total conhecimento das características referentes ao substrato, a fim de buscar evitar fatores que o levem à sobrecarga orgânica, culminando com o colapso do sistema.

Em outro estudo, conduzido por Mahat *et al.* (2020), os pesquisadores analisaram a influência da codigestão anaeróbia entre as águas residuárias de processamento de alimentos, na condição de substrato, e lodo de digestor anaeróbio, na condição de inóculo, nas proporções (S / I) de 1,0, 1,5 e 2,0, durante um TDH de 54 dias. Tal pesquisa visou analisar o desempenho das codigestões em relação à remoção de carga orgânica (DBO e DQO), bem como

à remoção de sólidos voláteis e totais (SV e ST), de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) e de fósforo total (P).

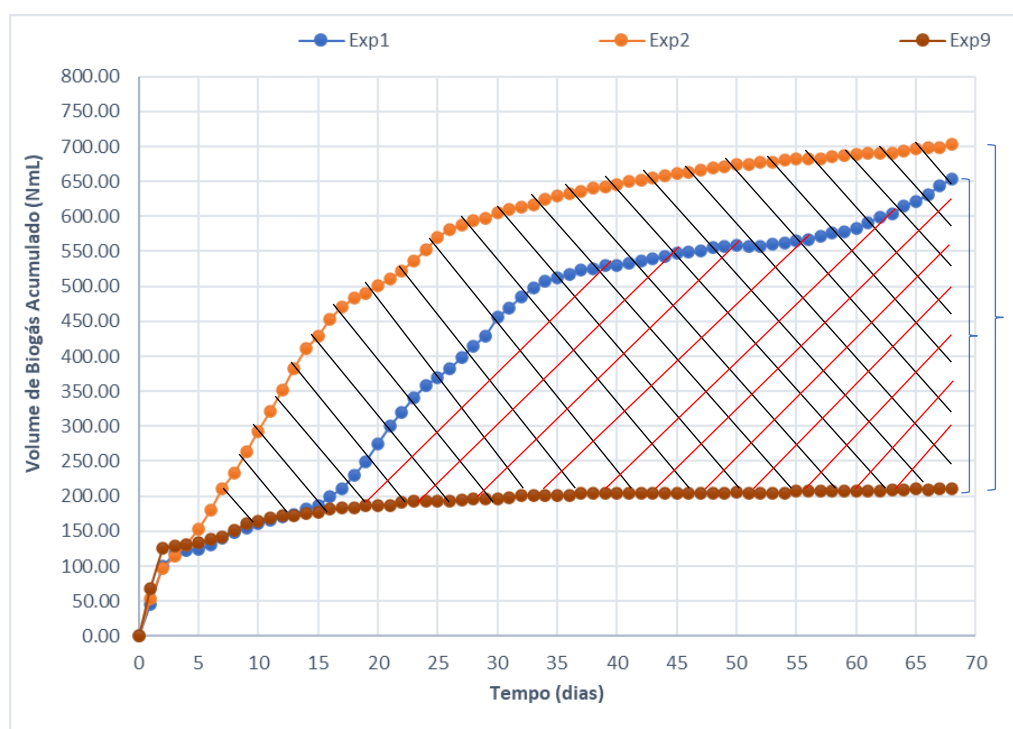
No que tange à remoção de demanda química de oxigênio (DQO), sob as proporções (S / I) de 1,0, 1,5 e 2,0, em um TDH de 54 dias, foram contatados resultados de 97, 94 e 82%; em relação à demanda bioquímica de oxigênio (DBO), os resultados obtidos foram melhores, 97, 95, 93% de redução de carga orgânica, respectivamente. Em relação à remoção de sólidos totais, as reduções foram de 86, 76 e 52%, para as proporções (S / I) de 1,0, 1,5 e 2,0 (MAHAT *et al.*, 2020).

Acerca do percentual de remoção de sólidos voláteis, verifica-se que a proporção de S / I = 1,0 obteve 65% de remoção, ante 50% de remoção 1,5 e 2,0, respectivamente (MAHAT *et al.*, 2020).

Através destes dados, Mahat *et al.* (2020) expõem o quanto a variação da relação substrato / inóculo interfere no desenvolvimento, nas funções e nos princípios do processo de digestão anaeróbia. O aumento da relação gera aumento da quantidade de sólidos voláteis (e consequentemente sólidos totais), assim como de microrganismos, no ambiente, elevando a concentração de carga orgânica, culminando no aumento do teor de nitrogênio amoniacal.

Ao variar a massa de substrato e o volume de inóculo, ou seja, ao confrontar o desempenho do Experimento 9 com os desempenhos dos Experimentos 1 e 2, verifica-se um aumento considerável na Geração Acumulada de Biogás (Figura 18).

Figura 18 – O desempenho da Geração Acumulada de Biogás entre os Experimentos 1, 2 e 9.



Fonte: O autor (2021)

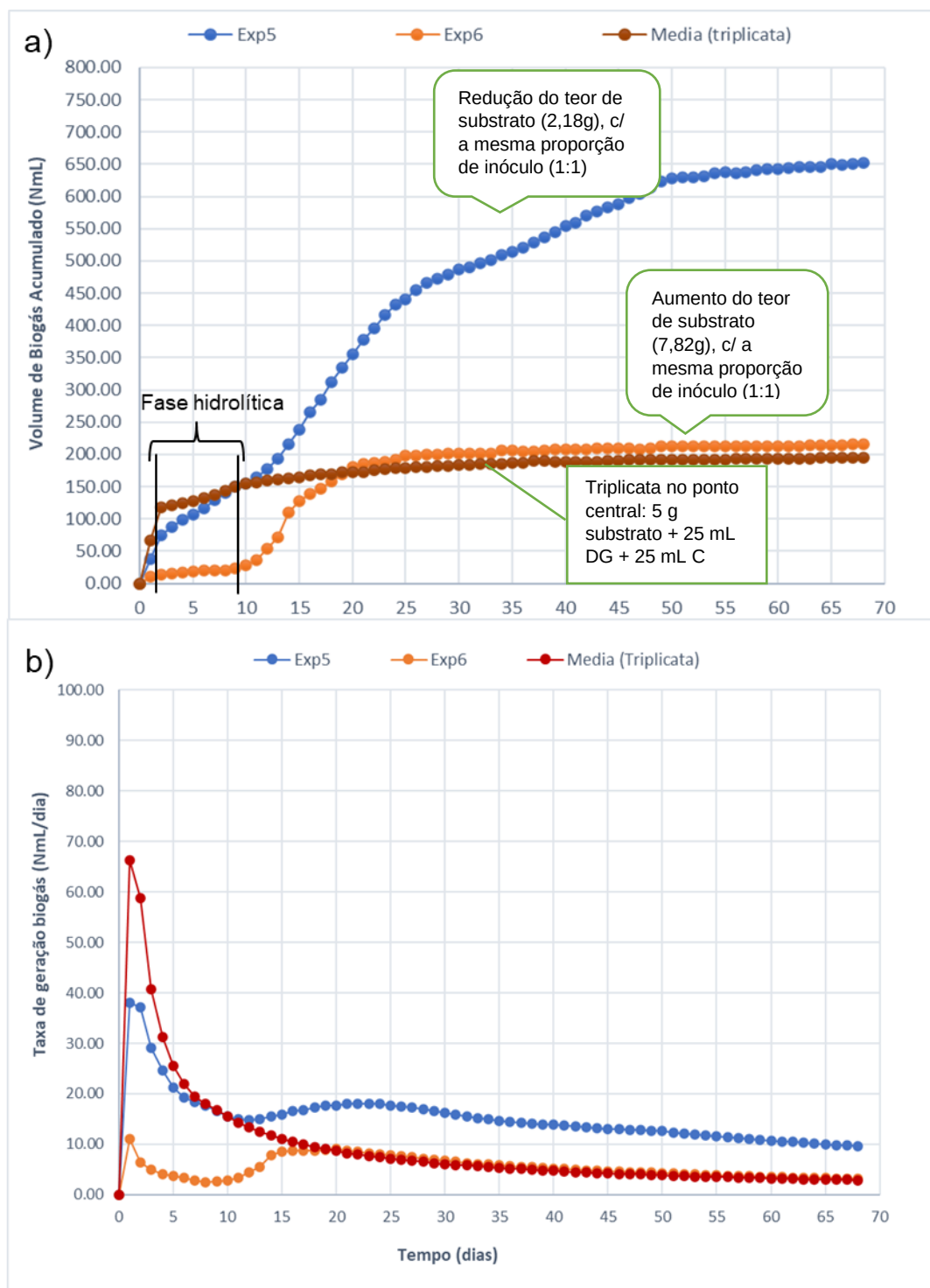
Analisando-se a Figura 18, observa-se, de imediato, uma discrepância entre os desempenhos dos Experimentos 9, 1 e 2. Além da redução na quantidade de substrato inserida, de 40%, dos 5 g de substrato no Experimento 9 para 3,0 g nos Experimentos 1 e 2.

Esta variação refletiu numa leve redução da carga orgânica, assim como no aumento do pH do sistema, propiciando uma melhoria do rendimento de biogás. Ao realizar uma comparação entre as gerações acumuladas de biogás dos Experimentos 1 e 2, verifica-se que o Experimento 2 apresenta uma resposta, em termos de geração de biogás, mais rápida do que o Experimento 1, visto que, em um período de 20 dias, o referido experimento atingiu um volume acumulado de 500 NmL, o que representa 71,41% do total produzido.

A razão determinante para a mais alta geração de biogás referente ao Experimento 2, deve-se ao maior conteúdo de digestato presente no volume total de inóculo, o qual, neste experimento, compreendeu 42,73 mL DG. Este realizou uma função primordial no processo de tamponamento do sistema, evitando a queda do pH.

O Experimento 1, por sua vez, contendo maior volume de consórcio microbiano, 42,73 mL, e 7,27 mL de digestato, obteve um bom desempenho, porém inferior ao Experimento 2, devido ao fato de o consórcio microbiano não apresentar as propriedades de tamponamento conferidas ao digestato, a fim de apresentar uma produção de biogás semelhante ao Experimento 1.

Figura 19 – a) Volume Acumulado e b) Taxa de Geração de Biogás dos Experimentos 5, 6 e a média das triplicatas.



Fonte: O autor (2021)

Verificando-se a Figura 19 a, observa-se um grande impacto no desempenho descrito pelo Experimento 6, uma vez que foi a configuração que recebeu a maior quantidade de substrato. A sua Taxa de Geração de Biogás, no período entre o 2° e o 12° dia, apresentou um impacto negativo, devido, principalmente, ao pH e ao teor de sólidos voláteis do experimento, os quais contribuíram efetivamente para a ocorrência de uma queda brusca da taxa diária. Conforme explicitado, pode-se caracterizar este período como sendo a Fase Hidrolítica, sendo esta a fase limitante do processo de digestão anaeróbia (MORALES-POLO *et al.*, 2018; LE PERA *et al.*, 2021).

O Experimento 5 descreve um comportamento semelhante ao Experimento 6, porém isso não se reproduz em números. Por conter um menor teor de substrato (e um menor teor de sólidos voláteis), o n. 5 apresentou um bom desenvolvimento do pH do sistema, o que reproduz em uma boa fermentação anaeróbia.

No que diz respeito à Figura 19 a, observou-se que no 25° dia de geração de biogás, foi atingido o percentual de 69,23% (450 NmL) do montante de 650,00 NmL, referente ao Experimento 5.

O período de inibição (ou estagnação) na Produção Acumulada de Biogás vivenciado pelo Experimento 6, entre os primeiros dias de biodigestão pode representar a inviabilidade desta proporção, se realizada em ampla escala ou escala industrial. Ainda é possível verificar que a sua produção praticamente findou ao 20° dia de fermentação, no qual obteve 80,13% do montante da geração de biogás, atingindo 172,98 NmL (POSMANIK *et al.*, 2020).

5.6. Potencial Bioquímico do Metano oriundo dos biodigestores BMP

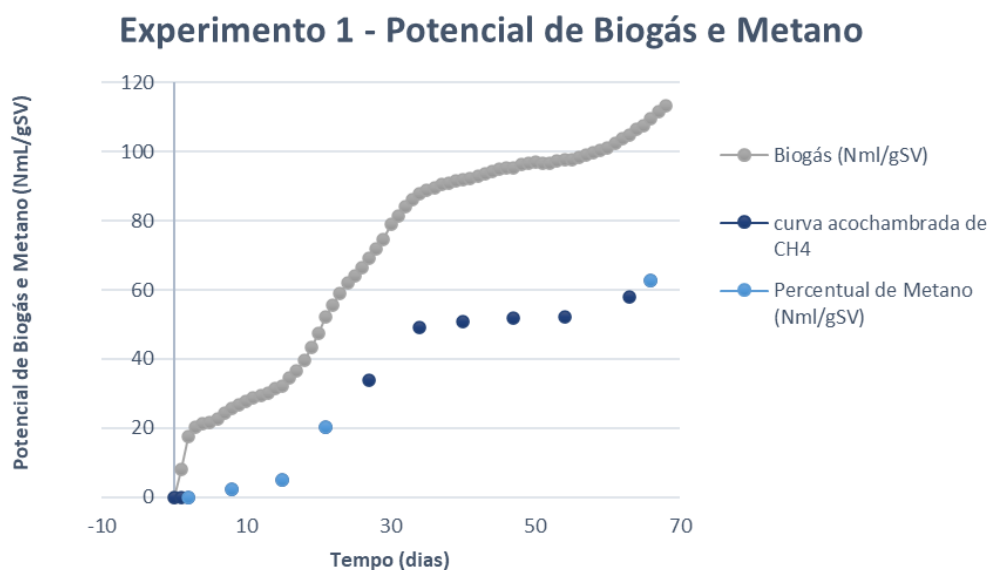
Tomando-se por base os valores percentuais de metano obtidos a partir de análises realizadas em Cromatógrafo gasoso, bem como o montante de biogás e as massas de resíduos existentes e provenientes de cada experimento realizado, foi possível plotar os gráficos referentes aos Potenciais Bioquímicos do Metano.

Uma vez que esta determinação está intimamente relacionada à quantidade de sólidos voláteis existente em cada biodigestor, depreende-se, de imediato, que o $\text{mLCH}_4 / \text{gSV}$ irá variar consideravelmente.

Não necessariamente, a configuração que conteve o maior teor de sólidos voláteis (no caso, o Experimento 6) apresentou o maior potencial de biogás, tampouco o maior potencial de metano. Há diversos estudos e pesquisadores que mencionam uma série de fatores intervenientes que o afetam diretamente, tanto físico-química quanto microbiológica, a qualidade do desenvolvimento fermentativo.

Assim sendo, a Figura 20 se refere ao gráfico do Potencial de Geração de Biogás e Metano, em NmL / gSV .

Figura 20 – Potencial Acumulado de Biogás e Metano provenientes do Experimento 1.

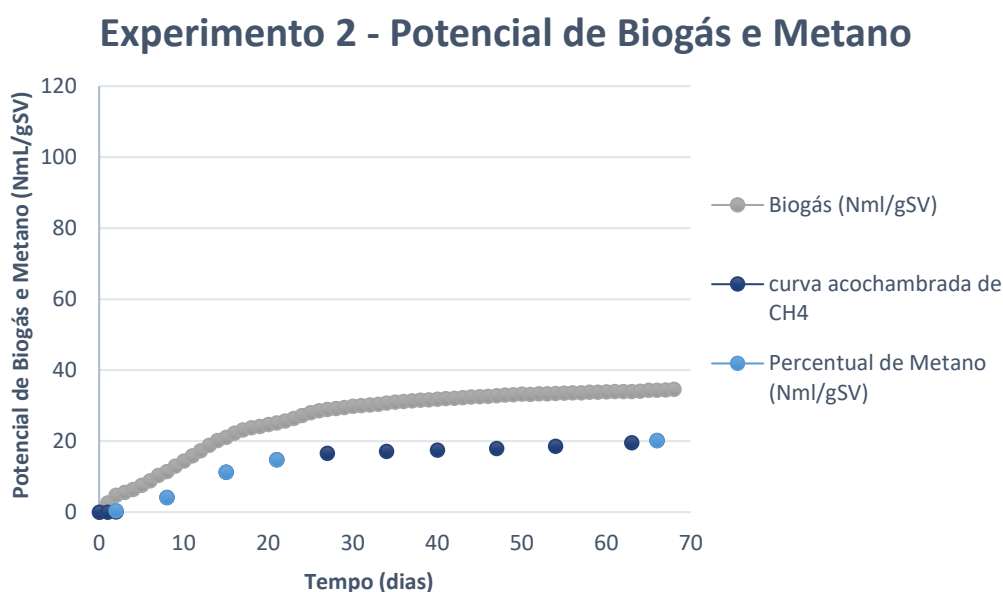


Fonte: O autor (2021)

Ao analisar a Figura 20, observa-se, de imediato, a grande amplitude entre a curva do Potencial de biogás e de metano. O Experimento 1, por ter possuído uma pequena massa de substrato e de digestato, na condição de inóculo, apresentou uma grande quantidade de biogás produzido, uma vez que o denominador apresentou um baixo valor. Ainda assim, verificou-se que o Potencial de Biogás atingiu um montante de $116 \text{ NmL} / \text{gSV}$. O Potencial de Metano, por sua vez, atingiu um total de $63 \text{ NmL} / \text{gSV}$.

Diferentemente do Experimento 1, que conteve um baixo teor de sólidos orgânicos, o Experimento 2 conteve a adição de um maior volume de digestato, que, conseqüentemente, agregou um maior volume de sólidos, entrando na equação de cálculo do potencial de geração de biogás na condição de elemento denominador, resultando em baixo valor de potencial de biogás e metano, conforme observado no gráfico apresentado na Figura 21.

Figura 21 – Desempenho do Potencial de Biogás e Metano referente ao Experimento 2.



Fonte: O autor (2021)

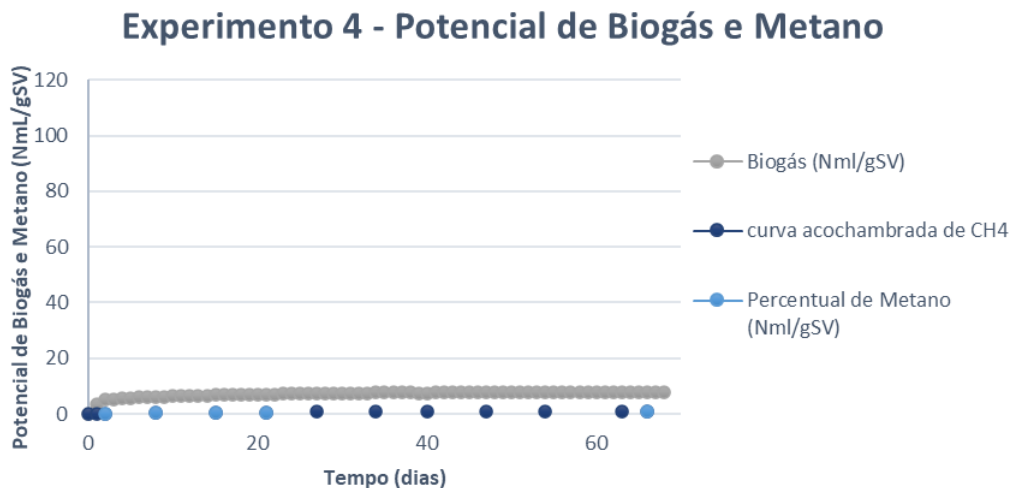
Verifica-se, na Figura 21, que o Potencial de Biogás atingiu um valor máximo de 34,60 NmL / gSV. O Potencial de metano, por sua vez, alcançou um valor máximo de 20 NmL / gSV.

No que tange à quantidade de biogás e metano entre os Experimentos 1 e 2, verifica-se que, ambos tinham a mesma quantidade de substrato, porém com quantidades de inóculos diferentes. Apesar de não influenciado no desempenho do pH, o aumento na quantidade de inóculo, conferido pelo maior volume de digestato, resultou no aumento do teor de sólidos voláteis, sendo preponderante para redução do potencial de biogás.

Faz-se necessário evidenciar que os Experimentos 3, 6 e 7 não chegaram a produzir gás metano, devido ao pH do meio fermentativo ser o principal fator de impedimento à atividade metanogênica (ABUBAKAR *et al.*, 2022; MOTTA *et al.*,

2022). Em virtude disso, não foi gerado o gráfico de geração de metano para tais experimentos.

Figura 22 – Desempenho do Potencial de Biogás e metano referente ao Experimento 4.



Fonte: O autor (2021)

No que diz respeito ao gráfico do Potencial de Biogás e Metano do Experimento 4 (Figura 22), verifica-se que a massa de substrato (7 g de resíduos orgânicos), juntamente com os sólidos orgânicos existentes no digestato, foram primordiais para a ocorrência de uma “tímida” ou irrisória curva de geração de biogás e metano, conforme exposto na Figura 22. Tais elementos, integrantes dos sólidos totais, foram elevados ao ponto de inibir os potenciais de biogás e metano a quase zero.

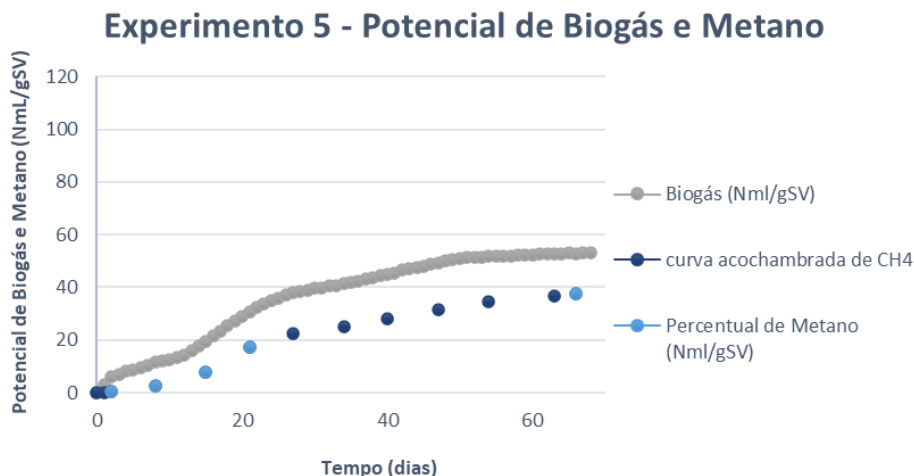
Ao verificar o pH do sistema ($\text{pH}_{\text{inicial}} = 5,5$ e $\text{pH}_{\text{final}} = 4,8$), fica ainda mais evidente a situação do processo biodegradativo, uma vez que o sistema fermentativo ainda conseguiu produzir uma quantidade ínfima de biogás e metano, mas, provavelmente, a contínua e intensa atividade acidogênica microbiana comprometeu a evolução do sistema.

Diante deste cenário, constata-se que os Potenciais de Biogás e Metano atingiram, respectivamente, 7,93 NmL/gSV e 0,77 NmL/gSV.

Já o Experimento 5 (Figura 23), apresentou dados de melhor relevância, em termos de potenciais de biogás e metano, uma vez que apresenta uma massa de substrato de 2,18 g, e baixo teor de digestato como inóculo (25 mL). Verifica-

se, também, que este experimento obteve um ótimo percentual de redução de sólidos voláteis, atingindo, ao final do ensaio BMP, 22% de redução (Figura 23). Isso consiste em uma importante informação, uma vez que é um indicativo da ocorrência uma boa fluidez de fermentação anaeróbia.

Figura 23 – Desempenho do Potencial de Biogás e Metano do Experimento 5.



Fonte: O autor (2021)

Tal experimento atingiu um valor final de potencial de biogás de 53 NmL / gSV. O potencial de metano chegou a 37,76 NmL / gSV. Os valores de pH do meio anaeróbio do experimento evidenciam-se como adequado à biodigestão, estando ele entre 5,5 e 7,5.

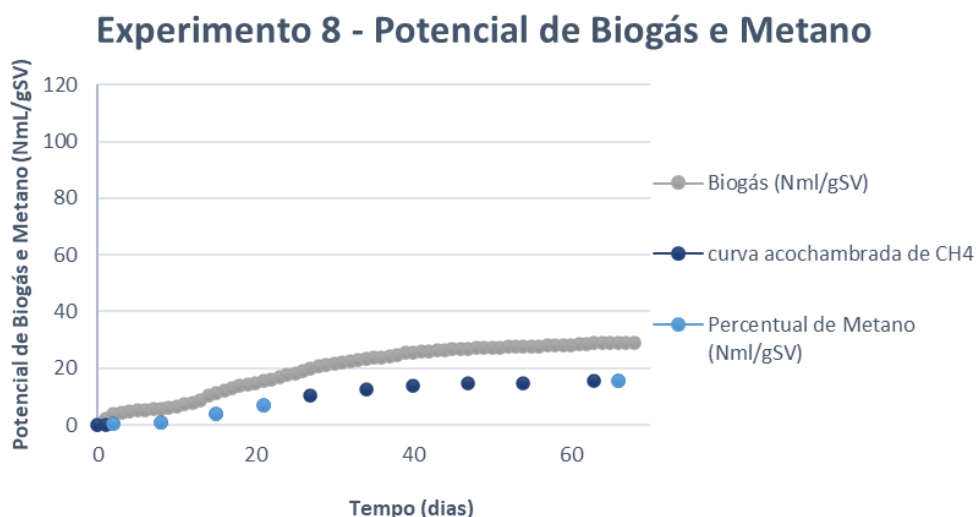
O Experimento 8 (Figura 24) segue os fatores evidenciados e justificados anteriormente, como teor de sólidos orgânicos presentes no substrato e no digestato. O pH ambiente encontra-se dentro do intervalo adequado à ocorrência da biodigestão. O percentual de redução do teor de sólidos voláteis atingiu 15%, o que consistiu no terceiro valor mais alto de redução de carga orgânica.

Todos estes valores convergem e contribuem para uma boa digestão anaeróbia, e conseqüentemente, um considerável potencial de biogás e de metano. Porém, os sólidos totais presentes no meio (5 g de resíduos orgânicos) foram determinantes para a queda dos valores.

Diante disso, observa-se que o Potencial de Biogás e de Metano do Experimento 8 atingiram os montantes de 29,13 NmL / gSV e 15,76 NmL / gSV, respectivamente. Comparando-se estes valores com os obtidos pelo

Experimento 1, observa-se que o Experimento 8 registrou uma queda de 74,28% ou 3,88 vezes e de 74,81% ou 3,97 vezes nos Potencial de Biogás e de Metano, respectivamente.

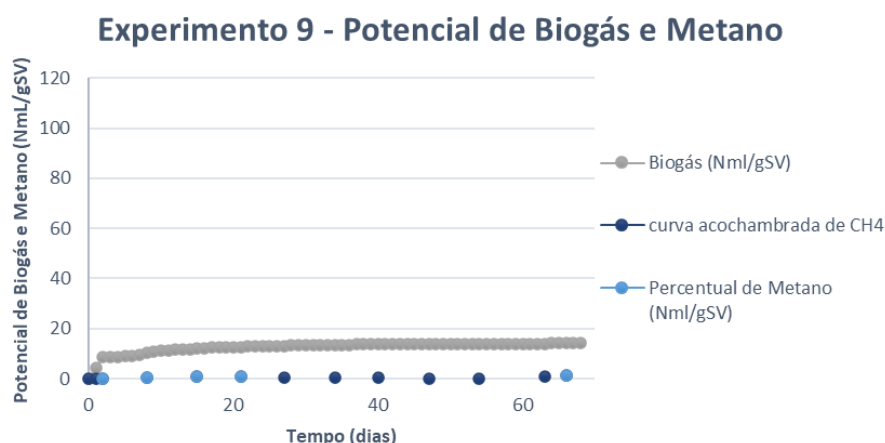
Figura 24 – Desempenho dos Potenciais de Biogás e Metano do Experimento 8.



Fonte: O autor (2021)

No que diz respeito ao Experimento 9 (Figura 25), verifica-se que este apresenta uma quantidade de massa de substrato (5 g) semelhante ao Experimento 8, porém com a metade do volume de digestato (25 mL), o que contribuiu fortemente para a maior redução do Potencial de Biogás e Metano do montante gerado, que foram, respectivamente, 14,17 NmL / gSV e 1,18 NmL / gSV. Além disso, este processo de biodigestão não foi positivo, uma vez que apresentou uma queda de pH, ocorrendo, portanto, uma acidificação do meio anaeróbico. Tal situação representou uma redução drástica de Potencial de Biogás, de 87,49% e 8 vezes inferior, bem como de Metano, de 98,11% e 53 vezes inferior, produzidos entre os Experimentos 1 e 9.

Figura 25 – Desempenho dos Potenciais de Biogás e Metano do Experimento 9.



Fonte: O autor (2021)

A alta carga orgânica, característica de substratos orgânicos, contribuiu veementemente para a ocorrência do processo de inibição da fermentação anaeróbia, conforme mencionado por Chen *et al.* (2008) e Akinbomi *et al.* (2022) e Hossain *et al.* (2022). O Experimento 9 (Figura 25), que diz respeito à média das triplicatas no ponto central, referente ao planejamento estatístico, foi elaborado utilizando-se 5 g do substrato orgânico, cuja quantidade foi preponderante para a queda do rendimento de biogás e metano, bem como para a ocorrência do processo inibitório.

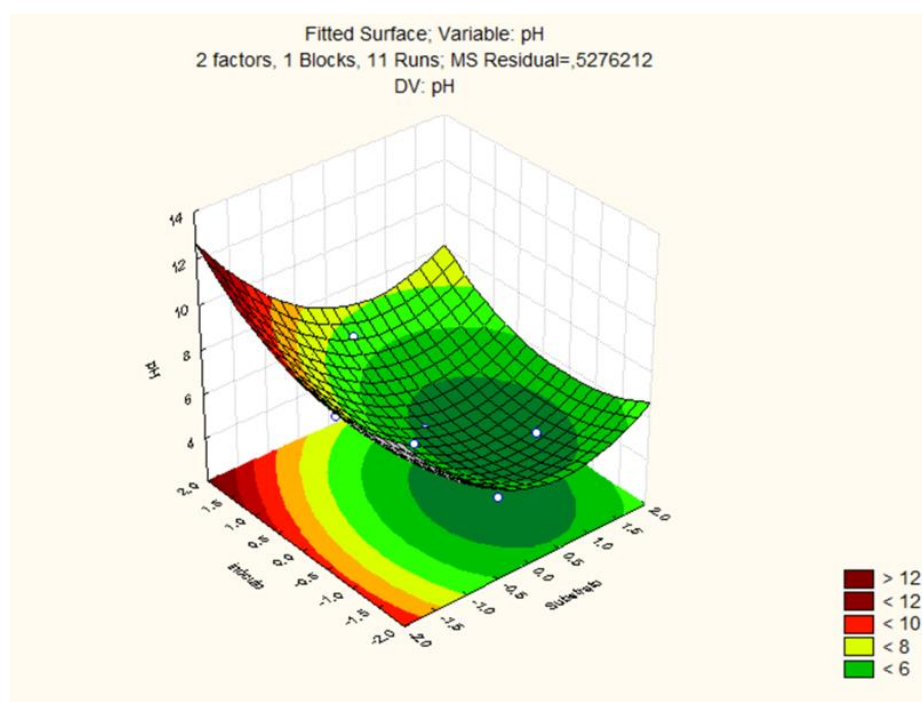
5.7. Metodologia da Superfície de Resposta para determinação de condições ótimas para a biodigestão anaeróbia

A fim de identificar as melhores configurações de experimento, quanto aos parâmetros operacionais, foi desenvolvida uma “malha” ou superfície de resposta, na qual é possível identificar as condições mais e menos apropriadas para a ocorrência de um ótimo processo anaeróbio.

De maneira inicial, foram obtidos valores referentes à relação substrato / inóculo, sendo elaborada a variável resultante pH do ambiente fermentativo.

A Figura 26, a seguir, expõe os valores de pH em função da variação da proporcionalidade entre a quantidade de substrato e o teor de inóculo.

Figura 26 – A variação do pH como fator resultante da relação entre substrato / inóculo.



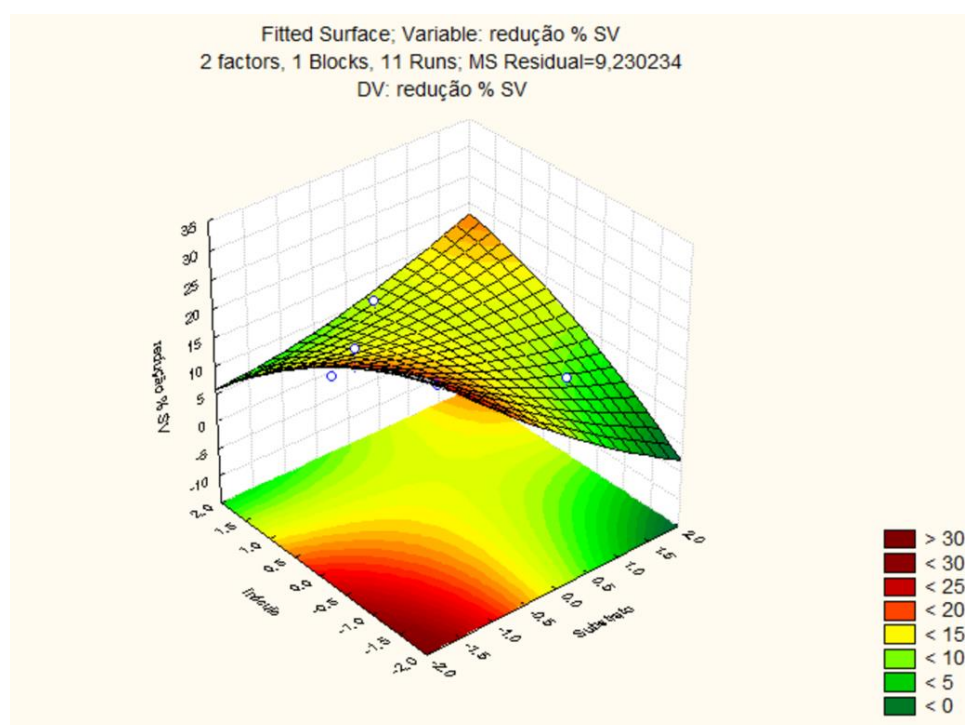
Fonte: O autor (2021)

À medida que ocorre uma redução do teor de substrato, verifica-se uma imediata melhoria das condições ambientais para a ocorrência da biodigestão. Diante disso, verifica-se, nitidamente, que os experimentos presentes à esquerda na Figura 24, ou seja, os Experimentos 1 (-1,0;0,0), 2 (-1,0;1,41) e 5 (-1,41;0,0) apresentaram pHs dentro da faixa adequada para o desenvolvimento da fermentação, permitindo a geração do biogás.

Por outro lado, é observado o quanto o teor de substrato influencia o pH do sistema bioquímico, uma vez que, à medida que se aumenta a quantidade deste componente, o pH do meio se reduz a tal ponto que torna insustentável a ocorrência da fermentação anaeróbia. Conforme mencionado por diversos autores, entre eles Janesch *et al.* (2021) e Wang *et al.* (2022), um substrato caracterizado como uma substância de baixa relação carbono / nitrogênio, contribui para um ambiente com alta concentração de compostos nitrogenados, nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$), cujos compostos químicos são danosos aos microrganismos, uma vez que têm a capacidade e a habilidade de permear, com certa facilidade, a membrana plasmática celular, provocando distúrbios e instabilidade no meio intracelular, e culminando com a ruptura ou “lise” (morte) da célula (CHEN *et al.*, 2008; GONZÁLEZ *et al.*, 2022).

No que concerne à redução do teor de sólidos voláteis, que consiste em um fator de grande importância para a determinação da eficiência do processo biodegradativo anaeróbico, uma vez que está intrinsecamente associada à sintetização da matéria orgânica existente no biodigestor, a Figura 27 mostra o intervalo, no eixo do substrato, $-2,0 < SV < -0,5$, e no eixo do inóculo, $-2,0 < SV < 0,0$, como a região que concentra os maiores teores de redução de sólidos voláteis.

Figura 27 – Variação do percentual de redução do teor de sólidos voláteis nos Experimentos analisados.



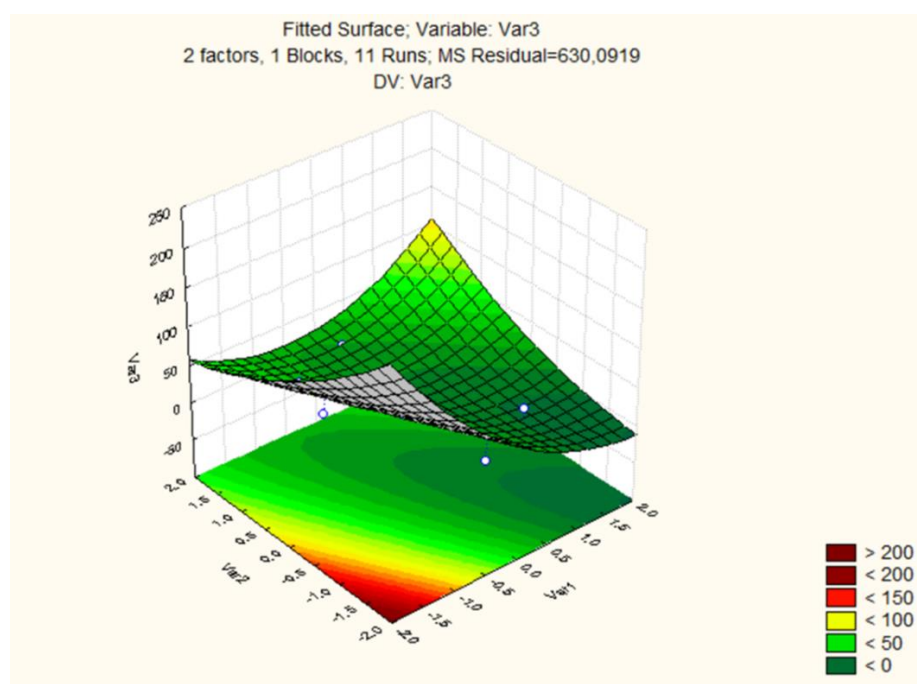
Observando-se atentamente o gráfico da Figura 27, depreende-se que a ondulação (ou curvatura) identificada na superfície de resposta se deve à variação do teor de sólidos voláteis presente em cada biorreator. Verifica-se, também, que os biodigestores que apresentam os menores teores de sólidos voláteis apresentam bons valores de metano, uma vez que o potencial de metano é obtido através da razão do seu volume pelo teor de sólidos voláteis ou totais (ADMASU *et al.*, 2022).

Além disso, no que diz respeito ao Potencial Acumulado de Biogás (Figura 28), verifica-se que o mesmo, no gráfico de superfície de resposta, apresentou um comportamento inversamente proporcional à concentração de substrato, ocorrendo, desta forma, uma mínima quantidade de biogás produzida.

Sobretudo quando houve uma alta proporção substrato / inóculo, verificou-se essa baixa produção de biogás, corroborando, portanto, os diversos estudos existentes na literatura.

Da mesma forma, uma baixa relação substrato / inóculo ($S / I < 1$) proporciona, ao processo fermentativo anaeróbio, boas condições ambientais e operacionais (pH, carga orgânica etc.) em prol de um bom desempenho da anaerobiose (Figura 28).

Figura 28 – Potencial acumulado de biogás em função da relação substrato / inóculo.

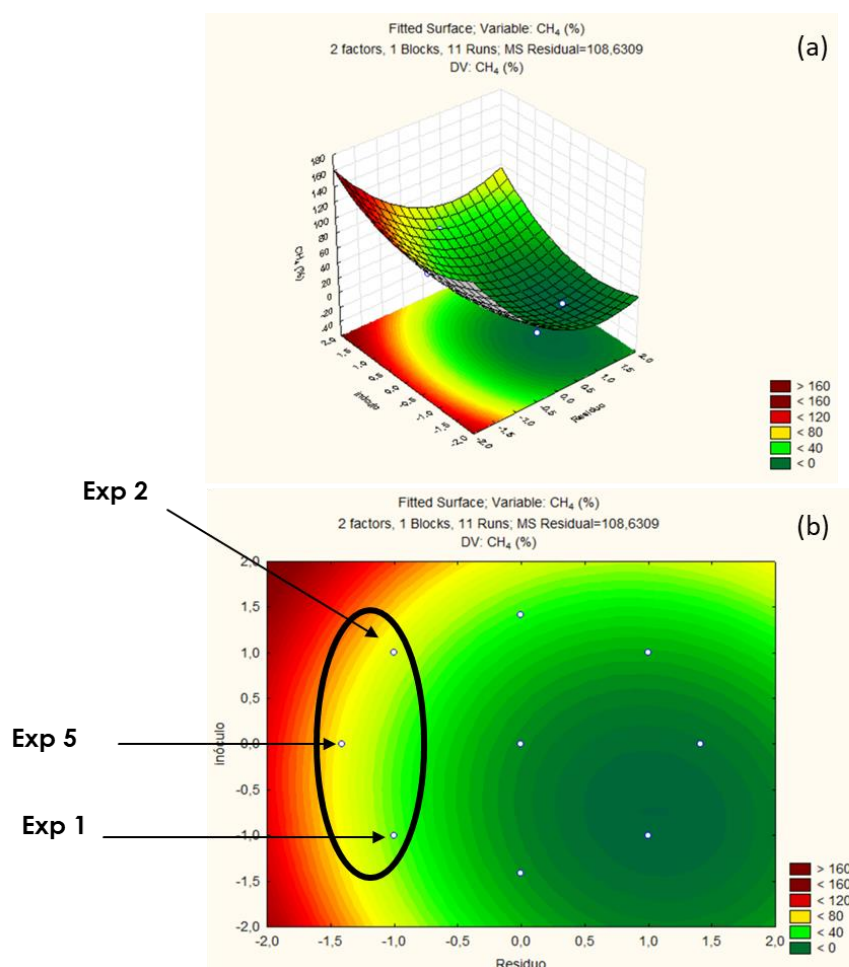


Fonte: O autor (2022)

Além disso, apesar de possuir uma baixa proporção carbono / nitrogênio, o substrato interfere consideravelmente no processo bioquímico, uma vez que tanto a formação de compostos carbonáceos quanto nitrogenados podem se acumular no interior do biodigestor, influenciando na cinética de conversão da matéria orgânica.

A Figura 29, por sua vez, expressa informações acerca dos percentuais de metano em função da relação substrato / inóculo. Observa-se que os Experimentos 1, 2 e 5 apresentaram os melhores resultados, cujas relações substrato / inóculo foram inferiores a 1:15 (1:16,67, 1:22,94) (Figura 29 b).

Figura 29 – (a) Gráfico referente ao percentual de metano produzido nos Experimentos realizados, (b) Experimentos que se destacaram no percentual de geração de metano.



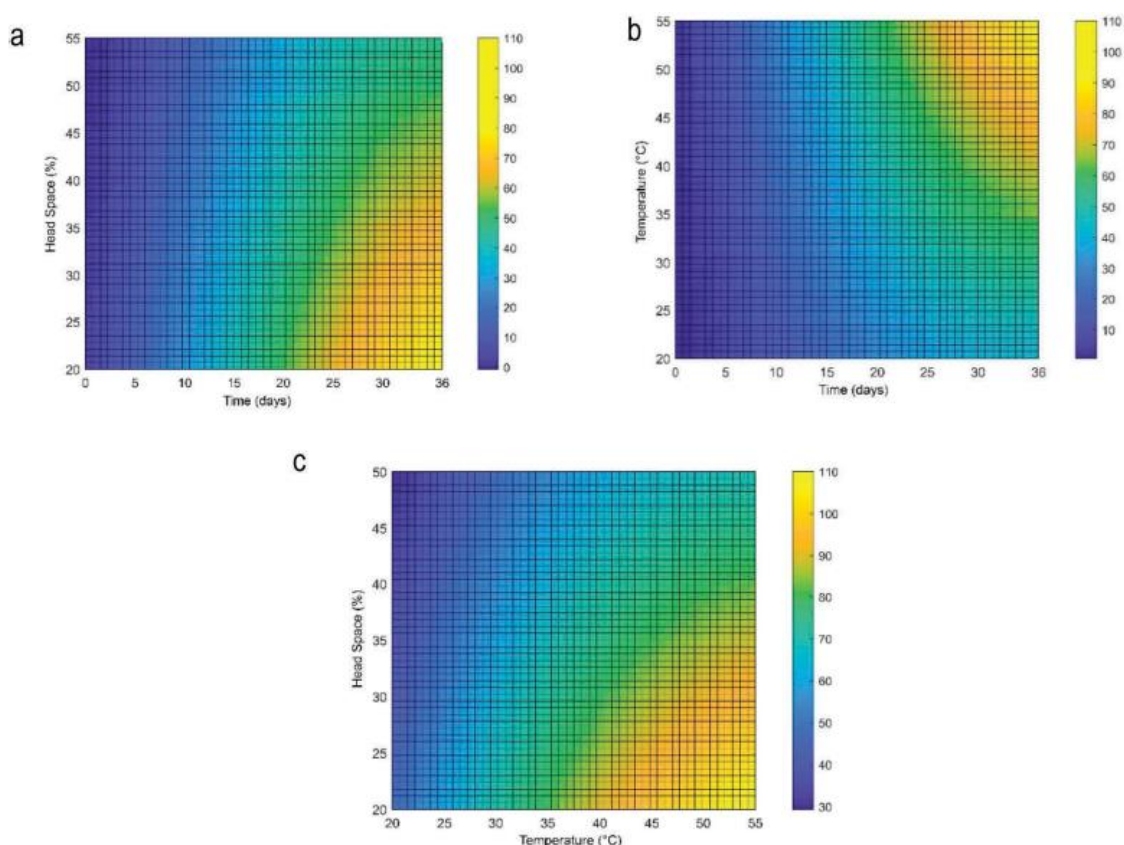
Fonte: O autor (2022)

Semelhante a este estudo, e fundamentando-se em ferramentas estatísticas, Casallas-Ojeda *et al.* (2020) desenvolveu sua pesquisa, subordinando a geração de metano a variáveis como o *headspace*, o tempo e a temperatura. Utilizando-se como substrato resíduos alimentares oriundos de um restaurante universitário, e um inóculo formado por uma mistura de lodo floculento e lodo granular, na proporção de 75:25 (3:1, V/V), obtidos de um digestor anaeróbio oriundo de ETE e de um reator anaeróbio existente em um abatedouro de bovinos e suínos.

Estes pesquisadores desenvolveram o delineamento experimental composto central, no qual utilizou, como variáveis, a temperatura e o *headspace*. Foi adotada uma relação substrato / inóculo de 1 gSV_{substrato} / gSV_{inóculo}, na referida pesquisa, utilizando-se nove experimentos.

Ao se esboçar as superfícies de resposta (Figura 30), com base em ferramenta estatística, é verificado que a geração de metano é inversamente proporcional ao *headspace*, pois, quanto maior se torna o *headspace*, menor se torna o percentual de metano. Já, no que diz respeito à temperatura, a geração de metano é diretamente proporcional a esta, pois quanto maior a temperatura, maior será a cinética de geração de biogás e metano.

Figura 30 – Gráficos de superfície de resposta (DCCR) acerca dos teores de metano em relação a: a) headspace (%); b) temperatura (°C); c) headspace (%) em função da temperatura (°C).

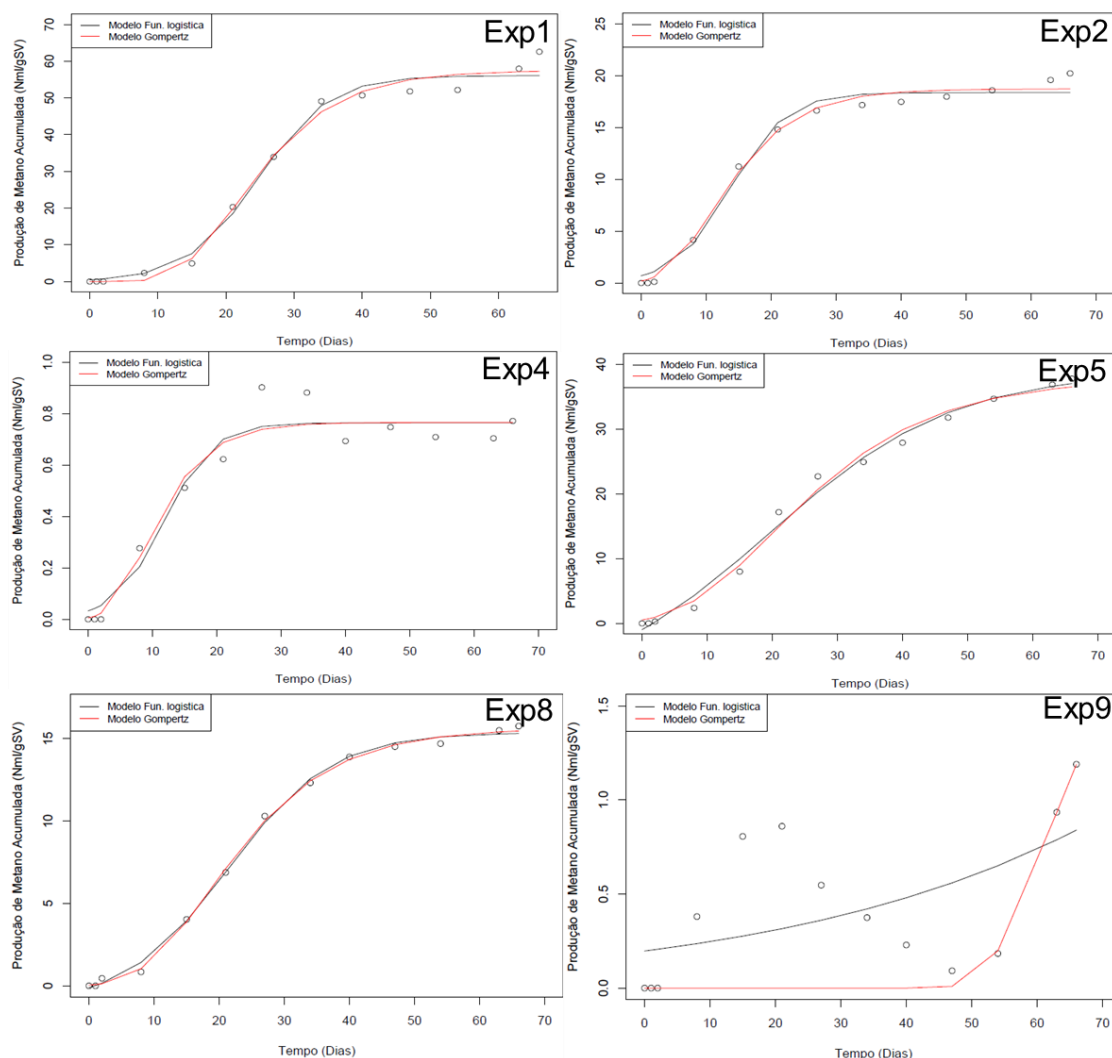


Fonte: Casallas-Ojeda *et al.* (2020)

Assim sendo, os gráficos de superfície de contato proporcionam ao pesquisador, bem como ao leitor as melhores e piores condições (através das variações de quantidade de fatores) às quais são submetidos os substratos e inóculos, visando à otimização da produção de biogás e metano. Além disso, tal ferramenta permite a realização de simulações a partir de intervalos de valores nos eixos “x” e “y” que norteiam a tomada de decisão (CASALLAS-OJEDA *et al.*, 2020).

5.8. Análise cinética do processo biodegradativo anaeróbico e a geração de metano dos experimentos realizados

Figura 31 - Comportamento do potencial de geração de metano dos experimentos estudados.



Fonte: O autor (2021)

A Figura 31 apresenta os comportamentos dos Experimentos 1, 2, 4, 5, 8 e 9 em relação ao potencial de geração de metano. Verifica-se que, os experimentos que continham maiores teores de sólidos voláteis apresentaram menores potenciais de metano, tanto devido ao fato de um elevado teor sólidos voláteis poder representar sobrecarga orgânica a um fermentador anaeróbico, como ao fato de que o lançamento de valores de sólidos voláteis, nos respectivos cálculos do potencial de biogás e metano, resulta em menores valores (BLASIUS *et al.*, 2020). Os Experimentos 1, 2 e 5 despontaram como as melhores

configurações referente ao potencial de geração metano, sendo corroborados pelos seus indicadores pH e sólidos voláteis.

O modelo modificado de Gompertz pode ser utilizado para ajustar a relação entre a produção acumulada de biogás e o tempo de fermentação (HONGGUANG *et al.*, 2019). Hu *et al.* (2015) usou o modelo modificado de Gompertz para a realização do processo de fermentação da *Typha*, e verificou que o processo hidrolítico é a principal razão para limitação da digestão anaeróbia da *Typha*.

Assim sendo, o modelo modificado de Gompertz (Equação 06) pode ser ajustado e utilizado para a digestão anaeróbia mista de suínos mortos e dejetos de suínos, e analisa o efeito da proporção de suínos mortos no processo fermentativo.

$$L(t) = L_0 * \exp \{-\exp [R_b * e / L_0 * (\lambda - t) + 1]\}$$

Eq. 06

Onde:

$L(t)$ = produção acumulada de biogás / metano (NmL.g⁻¹SV);

L_0 = refere-se ao potencial de produção de biogás / metano (NmLCH₄.g⁻¹SV);

R_b = taxa máxima de produção de biogás / metano (NmL/d);

λ = refere-se à fase *lag* (d) que é o tempo necessário para os microrganismos se aclimatarem ao ambiente ou o tempo necessário para produzir o biogás.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação à composição gravimétrica dos resíduos orgânicos, verifica-se uma quantidade majoritária de resíduos de frutas (~90%), os quais são constituídos principalmente por carboidratos, e têm potencial para acumulação de ácidos graxos voláteis, que podem provocar instabilidades no processo fermentativo anaeróbio;

As análises físico-químicas realizadas nas amostras de resíduos orgânicos mostram o seu elevado potencial de inibição da D.A., em função dos elevados valores de carga orgânica (DBO/DQO = 0,936) e sólidos voláteis (0,93 g/gST), baixa relação C/N (12,3), necessitando da aplicação de um agente equalizador do pH, a fim de viabilizar o processo bioquímico anaeróbio;

Os experimentos 1, 2, 5 e 8 apresentaram valores de pH inicial e final coerentes com a literatura específica e favoráveis para a ocorrência da fermentação anaeróbia;

É importante salientar que, nos primeiros dias da biodigestão ($0 \leq \text{TDH} \leq 4$ dias), o Experimento 1 apresentou um potencial de biogás de 20 NmL_{biogás}/gSV.dia, sendo duas vezes superior ao potencial de biogás do Experimento 5, 3,0 g RSU + 25 mL + 25 mL, que foi de 10 NmL_{biogás}/gSV.dia. O aumento de 1,7 vezes no volume de consórcio microbiano do Experimento 5 e do Experimento 1. Daí, destaca-se a contribuição do consórcio microbiano ao aumento do processo cinético da biodegradação anaeróbia e consequente produção de biogás.

Em 22 dias de biodigestão (TDH = 22 dias), o Experimento 1 atingiu um Potencial Acumulado de Biogás de, aproximadamente, 55 NmL_{biogás}/gSV.dia, que foi superior ao volume acumulado final de todas as oito demais configurações;

A respeito da análise do desempenho do consórcio microbiano facultativo na degradação anaeróbia de RSU em biorreatores BMP, verifica-se que, no que diz respeito à configuração central do experimento (exp. 9), 5 g RSU + 25 mL DG + 25 mL C, o potencial de biogás foi bastante inferior ao experimento (exp. 1), 3 g RSU + 7,27 mL DG + 42,73 mL C, as quais foram, respectivamente, 13

$\text{NmL}_{\text{biogás}}/\text{gSV.dia}$ e 113,26 $\text{NmL}_{\text{biogás}}/\text{gSV.dia}$. Verifica-se, assim, que o Experimento 1 obteve potencial de biogás 11,3 vezes maior que o Experimento 9.

Esta pesquisa proporcionou uma compreensão acerca do comportamento das produções de biogás e de metano resultantes das codigestões entre resíduos orgânicos e inóculos (digestato e consórcio microbiano) sob diferentes proporções substrato / inóculo (S:I):

- O Experimento “5 g RSU + 25 mLDG + 25 mLC”, que corresponde à relação S:I = 5:50 (ou 1:10), apresentou um baixo pH e um elevado teor de carga orgânica, o que interferiu negativamente na produção de biogás e metano;
- A redução da relação substrato / inóculo, representada pelos Experimentos 1, 2 e 5, os quais são compostos por, respectivamente, “3,0 g RSU + 7,27 mLDG + 42,73 mLC”, “3,0 g RSU + 42,73 mLDG + 7,27 mLC” e “2,18 g RSU + 25 mLDG + 25 mLC” apresentaram os melhores resultados de percentuais de metano gerados, atingindo 57,15%, 58,81% e 71,39%, nessa ordem;
- Por outro lado, o aumento da relação substrato / inóculo, sendo exemplificado pelos Experimentos 3, 4 e 6 (“7,0 g RSU + 7,27 mLDG + 42,73 mLC”; “7,0 g RSU + 42,73 mLDG + 7,27 mLC”; “7,82 g RSU + 25 mLDG + 25 mLC”) apresentou uma redução do percentual de metano, tanto que apenas o Experimento 4 produziu metano, e mesmo assim, em quantidades ínfimas de, aproximadamente, 10% v / v;
- Os experimentos 1, 2, 5 e 8 expuseram valores de pH inicial e final coerentes com a literatura específica e favoráveis para a ocorrência da fermentação anaeróbia;
- Por conterem menores teores de sólidos voláteis, os Experimentos 1, 2 e 5 apresentaram maiores valores de pH e os melhores resultados de potenciais de biogás e metano gerados no estudo;
- Conforme exemplificado pelo Experimento 7, o consórcio microbiano não apresenta capacidade de agente tamponante, sujeitando-se, portanto, à flutuação do pH do sistema, e contribuindo, desta forma, para a sua acidificação;
- O Experimento 1 apresentou o melhor desempenho em termos de Potencial Acumulado de Biogás, atingindo um valor máximo de 113,26

NmL/gSV. Tal Experimento é composto por 3 g RSU + 7,27 mL DG + 42,73 mL C, configuração esta que possui uma baixa carga orgânica, onde o baixo teor de 3 RSU e 7,27 mL de digestato, conferem a este um menor teor de sólidos voláteis;

- Foi observado que o digestato (DG) realizou, satisfatoriamente, a função de agente alcalinizante, sobretudo no Experimento 8, cuja composição do biorreator foi de “5 g RSU + 50 mL DG”, apresentando pH inicial e final, 6,0 e 7,0, respectivamente, os quais estão dentro do intervalo adequado para a ocorrência da fermentação anaeróbia;

- O Experimento 5 apresentou a maior redução de sólidos voláteis e o maior percentual de metano dentre todos os experimentos ($\approx 22\%$ e 60% , respectivamente), sendo seguido pelo Experimento 1 ($\approx 20\%$ e 59% , nessa ordem);

- No que diz respeito aos Potenciais de Metano, os Experimentos 1 e 5 apresentaram os melhores desempenhos, atingindo, respectivamente, 62,57 e 37,76 NmL_{CH₄}/gSV;

- Conforme exposto nos “Resultados e Discussão”, o consórcio microbiano contribuiu efetivamente para o aumento do volume de biogás e metano produzidos, bem como para a redução do teor de sólidos voláteis, atingindo a bioestabilização, no Experimento 1, ao 35º dia.

6. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

- Aplicação da técnica da bioaugmentação, utilizando consórcios microbianos sintéticos (fabricados em laboratório), na biodigestão de diferentes tipologias (frações) de resíduos sólidos orgânicos, a fim de analisar os desempenhos dos consórcios na biodegradação destes;
- Aplicação da técnica da bioaugmentação, na biodigestão anaeróbia de resíduos orgânicos, sob temperatura termofílica ($T > 40^{\circ}\text{C}$), visando otimizar a biodegradação e geração de biogás, em um menor tempo de detenção hidráulica;
- Estudar possibilidades de autodepuração do digestato, em um menor tempo de detenção hidráulica ($\text{TDH} < 150$ dias), a fim de proporcionar viabilidade do processo anaeróbio, ao aplicá-lo em escala industrial;
- Realizar um Planejamento DCCR, cujo termo central seja o $(-1;1)$, ou seja, $3,0\text{g RO} + 42,73 \text{ mLDG} + 7,27 \text{ mLC}$, a fim de desenvolver novas configurações BMP, resultando na plotagem de gráficos de geração de biogás e metano, bem como superfícies de resposta.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Y.; JAMIL, F.; RAFIQ, S.; GHOURI, M.; KHURRAM, M. S.; ASLAM, M.; BOKHARI, A.; FAISAL, A.; RASHID, U.; YUN, S.; MUBEEN, M. Valorization of solid waste biomass by inoculation for the enhanced yield of biogas. **Clean Technologies and Environmental Policies**, vol. 22, p. 513-522, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10098-019-01799-6>
- ABDEL-SHAIFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. Solid waste issue: Sources, composition, disposal, recycling, and valorization. **Egyptian Journal of Petroleum**, n. 27, p. 1275-1290, 2018.
- ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; PARK, H.; CHOI, O.; SINDHU, R.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A.; PARK, J. H.; SANG, B.-I. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, vol. 301, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122725
- ABUBAKAR, A. M.; SILAS, K.; AJI, M. M. An Elaborate Breakdown of the Essentials of Biogas Production. **Journal of Engineering Research and Sciences** 1(4), 93-118, 2022. <https://dx.doi.org/10.55708/js0104013>
- ADMASU, A.; BOGALE, W.; MEKONNEN, Y. S. Experimental and simulation analysis of biogas production from beverage wastewater sludge for electricity generation. **Scientific Reports** 12: 9107, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12811-3>
- AGUKO, K. P.; AWUOR, F. O.; OLOKO, M. O. Situation based solid waste source characterization: The Kibuye Market and other Peri-urban ward units – Kisumu City (Kenya). **International Journal of Emerging Technology and Advance Engineering**, vol. 10, n. 1, 2020.
- AHMAD, I.; ABDULLAH, N.; KOJI, I.; YUZIR, A.; MOHAMAD, S. E.; SHOW, P. L.; CHEAH, W. Y.; KHOO, K. S. The role of restaurant wastewater for producing bioenergy towards a circular bioeconomy: A review on composition, environmental impacts, and sustainable integrated management. **Environmental Resources**, vol. 214, 2022. doi.org/10.1016/j.envres.2022.113854
- AHMED, A. M. S.; BUEZO, K. A.; SAADY, N. M. C. Adapting anaerobic consortium to pure and complex lignocellulose substrates at low temperature: kinetics evaluation. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, vol. 8, p. 99-110, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40093-018-0238-2>
- AHN, J. H.; FORSTER, C. F. The effect of temperature variations on the performance of mesophilic and thermophilic anaerobic filters treating a simulated papermill wastewater. **Process Biochemistry**, vol. 37, Issue 6, p. 589-594, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00245-X)
- AKINBOMI, J. G.; PATINVOH, R. J.; TAHERZADEH, M. J. Current challenges of high-solid anaerobic digestion and possible measures for its effective applications: a review. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts** 15:52, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02151-9>

AKYOL, Ç. In search of the optimal inoculum to substrate ratio during anaerobic co-digestion of spent coffee grounds and cow manure. **Waste Management and Research**, vol. 38, n. 11, p. 1278-1283. doi.org/10.1177/0734242X20914731

ALBUQUERQUE, J. A.; DE LA FUENTE, C.; CAMPOY, M.; CARRASCO, L.; NÁJERA, I.; BAIXAULI, C.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A.; CEGARRA, J.; BERNAL, M. P. Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. **European Journal of Agronomy**, vol. 43, p. 119-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2012.06.001>

ALINA, S. O.; CONSTANTINSCU, F.; PETRUTA, C. C. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. **Romanian Biotechnological Letters**, vol. 20, n. 5, 2015.

ALVES, I. R. F. S. Análise experimental do potencial de geração de biogás em resíduos sólidos urbanos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008. 117 f.

AMODEO, C.; HAFNER, S. D.; FRANCO, R. T.; BENBELKACEM, H.; MORETTI, P.; BAYARD, R.; BUFFIÈRE, P. How Different Are Manometric, Gravimetric, and Automated Volumetric BMP Results? **Water**, vol. 12, n. 1839, p. 1-15, 2020. doi:10.3390/w12061839

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of micropollutants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, vol. 3, p. 117-129, 2004. doi: 10.1007/s11157-004-2502-3

ANGELIDAKI, I.; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; BORZACCONI, L.; CAMPOS, J. L.; GUWY, A. J.; KALYUZHNYI, S.; JENICEK, P.; VAN LIER. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, vol. 59, n. 5, 2009. doi: 10.2166/wst.2009.040

ANUKAN, A.; MOHAMMADI, A.; NAQVI, M.; GRANSTRÖM, K. A Review of the Chemistry of Anaerobic Digestion: Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. **Processes**, vol. 7, n. 504, 2019. doi:10.3390/pr7080504

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2004. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21st ed. Washington, 2005.

AWNY, N. M.; ABD-ELRAHMAN, A. M.; EL-GAWAD, A. S. A.; NEGM, S. S. Bacteriological studies on *Bacillus subtilis* and its bioremediation effect against lead toxicity. **Current Science International**, vol. 7, Issue 1, p. 83-90, 2018.

BAI, X.; CHEN, Y.-C. Synergistic effect and supernatant nitrogen reduction from anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. **Bioresource Technology Reports**, n. 10, 2020.

BHATTACHARYA, S. A. **Central Composite Design for Responsibility Surface Methodology and Its Application in Pharmacy**. In: Response Surface Methodology in Engineering Science. Publisher: IntechOpen, p. 1-19, 2021.

BENICHE, I.; HUNGRÍA, J.; EL BARI, H.; SILES, J. A.; CHICA, A. F.; MARTÍN, M. A. Effects of C/N ratio on anaerobic co-digestion of cabbage, cauliflower, and restaurant food waste. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00733-x>

BERNSTEIN, H. C.; CARLSON, P. R. Microbial consortia engineering for cellular factories: in vitro to in silico systems. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, vol. 3, Issue. 4, p. 1-9, 2012. <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201210017>

BHARATHIRAJA, B.; SUDHARSANA, T.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; PRAVEENKUMAR, R.; CHOZHAVENDHAN, S.; IYYAPPAN, J. Biogas production – A review on composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 90, p. 570-582, 2018.

BHATIA, S. K.; BHATIA, R. K.; CHOI, Y-K.; KAN, E.; KIM, Y-G.; YANG, Y-H. Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 38, n. 8, p. 1209-1229, 2018.

BIZET, J.; BIZET, C. Strains of *Alcaligenes faecalis* from Clinical Material. **Journal of Infection**, vol. 35, p. 167-169, 1997.

BLASIUS, J. P.; CONTRERA, R. C.; MAINTINGUER, S. I.; CASTRO, M. C. A. A. Effects of temperature, proportion and organic loading rate on the performance of anaerobic digestion of food waste. **Biotechnology Reports**, vol. 27, p. 1-9, 2020. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00503

BOLZONELLA, D.; BATTISTONI, P.; SUSINI, C.; CECCHI, F. Anaerobic codigestion of waste activated sludge and OFMSW: the experiences of Viareggio and Treviso plants (Italy). **Water Science and Technology**, vol. 53, p. 203-211. DOI: 10.2166/wst.2006.251

BRAVO, A. K. G.; SERRANO, D. A. S.; JIMÉNEZ, G. L.; NIRMALKAR, K.; MURUGESAN, S.; GARCÍA-MENA, J.; CASTILLO, M. E. G.; GÁLVEZ, L. R. T. Microbial Profile of the Leachate from Mexico City's Bordo Poniente Composting Plant: An Inoculum to Digest Organic Waste. **Energies**, vol. 12, n. 2343, p. 1-21, 2019. [doi:10.3390/en12122343](https://doi.org/10.3390/en12122343)

BRENNER, K.; YOU, L.; ARNOLD, F. H. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. **Trends in Biotechnology**, vol. 26, n. 9, p. 483-489, 2008. [doi:10.1016/j.tibtech.2008.05.004](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004)

BRITO, E. P. L.; LUCENA, T. V.; SANTOS, L. A.; FIRMO, A. L. B.; JUCÁ, J. F. T. Projeto de biodigestor em escala piloto para tratamento de resíduos orgânicos do Ceasa-PE. **XIX Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 25-27 de agosto 2021.

CARDONA, L.; LEVRARD, C.; GUENNE, A.; CHAPLEUR, O.; MAZÉAS, L. Co-digestion of wastewater sludge: Choosing the optimal blend. **Waste Management**, n. 87, p. 772-781, 2019.

CALISE, F.; CAPPIELLO, F. L.; CIMMINO, L.; D'ACADDIA, M. D.; VICIDOMINI, M. A Review of the State of the Art of Biomethane Production: Recent

Advancements and Integration of Renewable Energies. **Energies**, vol. 14, n. 4895, 2021. <https://doi.org/10.3390/en14164895>

CASALLAS-OJEDA, M. R.; MARMOLEJO-REBELLÓN, L. F.; TORRES-LOZADA, P. Evaluation of simultaneous incidence of head space and temperature on biochemical methane potential in food waste. **Cogent Engineering**, vol. 7, p. 1-25.

CASTELLÓN-ZELAYA, M. F.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Effects of solids concentration and substrate to inoculum ratio on methane production from fermented organic municipal solid waste. **Detritus**, vol. 15, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.31025/2611-4135/2021.15096>

CEASA-PE – Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco. **Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos (PGRS)**. Recife: CEASA-PE, 2017.

CERÓN-VIVAS, A.; CÁCERES, K. T.; RINCÓN, A.; CAJIGAS, Á. A. Influence of pH and the C/N ratio on the biogas production of wastewater. **Revista Facultad de Ingeniería**, Universidad de Antioquia, n. 92, p. 88-95, 2019. DOI: 10.17533/udea.redin.20190627

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 4044-4064, 2008. doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.057

CHEN, Y.; WANG, S.; GENG, N.; WU, Z.; XIONG, W.; SU, H. Artificially constructing mixed bacteria system for bioaugmentation of nitrogen removal from saline wastewater at low temperature. **Journal of Environmental Management**, vol. 324, 2022. doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116351

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; reatores anaeróbios**. 1. Ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, v. 5, 1997.

CHOW, W. L.; CHONG, S.; LIM, J. W.; CHAN, Y. J.; CHONG, M. F.; TIONG, T. J.; CHIN, J. K.; PAN, G-T. Anaerobic Co-Digestion of Wastewater Sludge: A Review of Potential Co-Substrates and Operating Factors for Improved Methane Yield. **Processes**, vol. 8, n. 39, p. 1-21, 2020.

CIFUENTES, I. E. M.; ÖZTÜRK, B. Exploring microbial consortia from various environments for plastic degradation. *In: Methods in Enzymology*, 2020. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.005>

CLERCQ, D. D.; WEN, Z.; GOTTFRIED, O.; SCHMIDT, F.; FEI, F. A review of global strategies promoting the conversion of food waste to bioenergy via anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 79, 204-221, 2017.

CONZELMANN, F.; BEITLICH, R. **Einfache Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit nach OECD 301 F mit dem Oxitop (A simple determination method of biodegradability according to OECD 301 F with the Oxitop system)**. Melland, October 1996, p. 700.

DANILOVA, I.; SHARIPOVA, M. The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, n. 1782, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01782

DAREIOTI, M. A.; VAVOURAKI, A. I.; TSIGKOU, K.; KORNAROS, M. Assessment of Single- vs. Two-Stage Process for the Anaerobic Digestion of Liquid Cow Manure and Cheese Whey. **Energies**, vol. 14, n. 5423, p. 1-14, 2021. doi.org/10.3390/en14175423

DARGODE, P.; MORE, P.; GORE, S.; SHARMA, M.; LALI, A. Design of Substrate Specific Consortium for Improved Biogas Production. **Acta Scientific Microbiology**, vol. 3, n. 2, p. 1-11, 2020. DOI: 10.31080/ASMI.2020.03.0501

DECHRUGSA, S.; KANTACHOTE, D.; CHAIPRAPAT, S. Effects of inoculum to substrate ratio, substrate mix ratio and inoculum source on batch co-digestion of grass and pig manure. **Bioresource Technology**, vol. 146, p. 101-108, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.051>

DEEPANRAJ, B.; SENTHILKUMAR, N.; RANJITHA, J. Effect of solid concentration on biogas production through anaerobic digestion of rapeseed oil cake. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, vol. 43, n. 11, p. 1329-1336. <https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1636902>

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from waste and renewable resources**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.

DÍAZ-BARAJAS, S. A.; GARZÓN-ZÚÑIGA, M. A.; MORENO-ANDRADE, I.; VIGUERAS-CORTÉS, J. M.; BARRAGÁN-GUERTA, B. E. Acclimation of microorganisms for an efficient production of volatile fatty acids and biogas from mezcal vinasse in a dark fermentation process. **Water Science and Technology**, vol. 83, Issue 11, p. 2724-2731, 2021. doi.org/10.2166/wst.2021.176

DIXON, P. J.; ERGAS, S. J.; MIHELICIC, J. R.; HOBBS, S. R. Effect of Substrate to Inoculum Ratio on Bioenergy Recovery from Food Waste, Yard Waste, and Biosolids by High Solids Anaerobic Digestion. **Environmental Engineering Science**, vol. 36, n. 12, 1459-1466, 2019.

EBNER, J. H.; LABATUT, R. A.; LODGE, J. S.; WILLIAMSON, A. A.; TRABOLD, T. A. Anaerobic co-digestion of commercial food waste and dairy manure: characterizing biochemical parameters and synergistic effects. **Waste Management**, vol. 52, p. 286-294, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.046>

EDWIGES, T.; FRARE, L. M.; ALINO, J.; TRIOLO, J. M.; FLOTATS, X. Methane potential of fruit and vegetable waste: an evaluation of the semi-continuous anaerobic mono-digestion. **Environmental Technology** vol. 41, n. 7, p. 1-25, 2018.

ELANGO, D.; PULIKESI, M.; BASKARALINGAM, P.; RAMAMURTHI, V.; SIVANESAN, S. Production of biogas from municipal solid waste with domestic sewage. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 141, n. 1, p. 301-304, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.003>

ELBESHBISHY, E.; NAKHLA, G.; HAFEZ, H. Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. **Bioresource Technology**, vol. 110, p. 18-25, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.025

ELLACURIAGA, M.; GARCÍA-CASCALLANA, J.; GÓMEZ, X. Biogas Production from Organic Wastes: Integrating Concepts of Circular Economy. **Fuels**, vol. 2, p. 144-167, 2021. doi.org/10.3390/fuels2020009

ERYILDIZ, B.; LUKITAWESA; TAHERZADEH, M. Effect of pH, substrate loading, oxygen, and methanogens inhibitors on volatile fatty acid (VFA) production from citrus waste by anaerobic digestion. **Bioresource Technology** 302, 122800, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122800>

FAO. **Global food losses and food waste** – Extent, causes and prevention, Food Loss, and Food Waste: Causes and Solutions. Rome, 2019.

FISGATIVA, 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**, vol. 188, p. 95-107, 2017. 10.1016/j.jenvman.2016.11.058

FLECK, L.; TAVARES, M. H. F.; EYNG.; ANDRADE, M. A. M.; FRARE, L. M. Optimization of anaerobic treatment of cassava processing wastewater. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, vol. 37, n. 3, p. 574-590, 2017. [dx.doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v37n3p574-590/2017](https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v37n3p574-590/2017)

GALBE, M.; WALLBERG, O. Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels** 12:294, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1634-1>

GINGICHASHVILI, S.; DUANIS-ASSAF, D.; SHEMESH, M.; FEATHERSTONE, J. D. B.; FEUERSTEIN, O.; STEINBERG, D. The Adaptive Morphology of *Bacillus subtilis* Biofilms: A Defense Mechanism against Bacterial Starvation. **Microorganisms**, vol. 8, n. 62, p. 1-13, 2020. doi:10.3390/microorganisms8010062

GÓMES-SANABRIA, A.; KIESEWETTER, G.; KLIMONT, Z.; SCHOEPP, W.; HABERL, H. Potential for future reductions of global GHG and air pollutants from circular waste management systems. **Nature Communications** 13:106, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27624-7>

GONZÁLEZ, R.; PEÑA, D. C.; GÓMEZ, X. Anaerobic Co-Digestion of Wastes: Reviewing Current Status and Approaches for Enhancing Biogas Production. **Applied Sciences** 12, 8884, 2022. <https://doi.org/10.3390/app12178884>

GUTIÉRREZ-FALCON, A.; PADILHA, D.; SOSA, M. J. R.; BARRASA, J. L. M.; ACOSTA-HERNÁNDEZ, B.; HENAO, A. S.; ÁLVAREZ, N. G.; MEDINA, I. R.; DÉNIZ, S.; REAL, F. Characterization *in vitro* of new bacterial strains showing potentially probiotic crossed effect against vibriosis in relevant fish species for marine aquaculture. **Journal of Applied Animal Research**, vol. 48, Issue 1, p. 553-558, 2020.

GUTIÉRREZ-FALCÓN, A. I.; RAMOS-NUEZ, A. M.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS Y ZAYAS, A.; PADILLA CASTILLO, D. F.; ISABEL GARCÍA-LAORDEN, M.; CHAMIZO-LÓPEZ, F. J.; REAL VALCÁRCCEL, F.; ARTILLES CAMPELO, F.; BORDES-BENÍTEZ, A.; NOGUEIRA SALGUEIRO, P.; DOMÍNGUEZ CABRERA, C.; RIVERO-VERA, J. C.; GONZÁLEZ-MARTÍN, J. M.;

MARIANO, M.O.H.; MACIEL, F.J.M.; FUCALÉ, S.P.; JUCÁ, J.F.T.; BRITO, A.R. (2007). Estudo da composição dos RSU do projeto piloto para recuperação do biogás no Aterro da Muribeca/PE. *VI Congresso Brasileiro de Geotecnia Ambiental –REGEO'2007*. Recife, PE.

MARTÍN CABALLERO, J.; FRÍAS-BENEYTO, R.; VILLAR, J.; MARTÍN-BARRASA, J. L. Probiotic Properties of *Alcaligenes faecalis* Isolated from *Argyrosomus regius* in Experimental Peritonitis (Rat Model). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, vol. 13, p. 1326-1337, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09767-7>

HAGELQVIST, A. Batchwise mesophilic anaerobic co-digestion of secondary sludge from pulp and paper industry and municipal sewage sludge. **Waste Management**, n. 33, p. 820-824, 2013.

HANSEN, T. L.; SCHMIDT, J. E.; ANGELIDAKI, I.; MARCA, E.; JANSEN, J. C.; MOSBAEK, H.; CHRISTENSEN, T. H. Method for determination of methane potentials of solid organic waste. **Waste Management**, vol. 24, p. 393-400, 2004.

HARDY, J.; BONIN, P.; LAZUKA, A.; GONIDEC, E.; GUASCO, S.; VALLETTE, C.; LACROIX, S.; CABROL, L. Similar Methanogenic Shift but Divergent Syntrophic Patterns in Anaerobic Digesters Exposed to Direct versus Successive Ammonium Additions. **Microbiology Spectrum**, vol. 9, n. 2, <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00805-21>.

HARIRCHI, S.; WAINAINA, S.; SAR, T.; NOJOUMI, S. A.; PARCHAMI, M.; PARCHAMI, M.; VARJANI, S.; KHANAL, S. K.; WONG, J.; AWASTHI, M. K.; TAHERZADEH, M. J. Microbiological insights into anaerobic for biogas, hydrogen, or volatile fatty acids (VFAs): a review. **Bioengineered**, vol. 13, n. 3, p. 6521-6557, 2022. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986>

HARNADEK, C. M. W.; GUILFORD, N. G. H.; EDWARDS, E. A. Chemical Oxygen Demand Analysis of Anaerobic Digester Contents. **STEM Fellowship Journal**, vol. 1, issue 2, 2015. DOI: 10.17975/sfj-2015-008

HAYS, S.; PATRICK, W. G.; ZIESACK, M.; OXMAN, N.; SILVER, P. A. Better together: engineering and application of microbial symbioses. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 36, p. 40-49, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.008>

HOLANDA, S. H. B. **Uso de consórcio microbiano facultativo no estudo da biodegradação e geração de biogás de resíduos sólidos urbanos envelhecidos em aterros**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal de Pernambuco.

HOLLIGER, C.; ALVES, M.; ANDRADE, D.; ANGELIDAKI, I.; ASTALS, S.; BAIER, U.; BOUGRIER, C.; BUFFIÈRE, P.; CARBALLA, M.; WILDE, V.; EBERTSEDER, F.; FERNÁNDEZ, B.; FICARA, E.; FOTIDIS, I.; FRIGON, J.-C.;

LACLOS, H. F.; GHASIMI, D. S. M.; HACK, G.; HARTEL, M.; HEERENKLAGE, J.; HORVATH, I. S.; JENICEK, P.; KOCH, K.; KRAUTWALD, J.; LISASOAIN, J.; LIU, J.; MOSBERGER, L.; NISTOR, M.; OECHSNER, H.; OLIVEIRA, J. V.; PATERSON, M.; PAUSS, A.; POMMIER, S.; PORQUEDDU, I.; RAPOSO, F.; RIBEIRO, T.; PFUND, F. R.; STRÖMBERG, S.; TORRIJOS, M.; VAN EEKERT, M.; VAN LIER, J.; WEDWITSCHKA, H.; WIERINCK, I. Towards a standardization of methane potential tests. **Water Science and Technology**, vol. 74, n. 11, p. 2515-2522, 2016. doi: 10.2166/wst.2016.336

HONGGUANG, Z.; JING, Y.; XIAOWEI, C. Application of Modified Gompertz Model to Study on Biogas production from middle temperature co-digestion of pig manure and dead pigs. **E3S Web of Conferences**, vol. 118, n. 3022, 2019. doi.org/10.1051/e3sconf/201911803022

HOSSAIN, M. S.; KARIM, T. U.; ONIK, M. H.; KUMAR, D.; RAHMAN, M. A.; YOUSOUF, A.; UDDIN, M. R. Impact of temperature, inoculum, flow pattern, inoculum type, and their ratio on dry anaerobic digestion of biogas production. **Scientific Reports** 12: 6162, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10025-1>

HU, Y.; WANG, F.; CHI, Y. The Evolution of Microbial Community during Acclimation for High Sodium Food Waste Anaerobic Digestion. **Waste and Biomass Valorization**, vol. 11, p. 6057-6063, 2020. doi.org/10.1007/s12649-019-00851-2

HU, Q. C.; TANG, X. Y.; NING, R. T. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering** 31, 1 (2015). (in Chinese with English abstract)

HÜLSEMANN, B.; ZHOU, L.; MERKLE, W.; HASSA, J.; MÜLLER, J.; OECHSNER, H. Biomethane Potential Test: Influence of Inoculum and the Digestion System. **Applied Sciences**, vol. 10, n. 2589, 2020. doi:10.3390/app10072589

JANESCH, E.; PEREIRA, J.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Phase Separation in Anaerobic Digestion: A Potential for Easier Process Combination? **Frontiers in Chemical Engineering**, vol. 3, n. 711971, p. 1-16, 2021. doi: 10.3389/fceng.2021.711971

JANKE, L.; WEINRICH, S.; LEITE, A. F.; STRÄUBER, H.; NIKOLAUSZ, M.; NELLES, M.; STINNER, W. Pre-treatment of filter cake for anaerobic digestion in sugarcane biorefineries: Assessment of batch versus semi-continuous experiments. **Renewable Energy**, vol. 143, p. 1416-1426, 2019. doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.029

JAWED, K.; YAZDANI, S. S.; KOFFAS, M. A. G. Advances in the development and application of microbial consortia for metabolic engineering. **Metabolic Engineering Communications** 9, p. 1-10, 2019.

JONES, C. A.; COKER, C.; KIRK, K.; REYNOLDS, L. Food waste co-digestion at water resource recovery facilities: business case analysis. **The Water Research Foundation**, 252 p., 2019.

JOUANNEAU, S.; RECOULES, L.; DURAND, M. J.; BOUKABACHE, A.; PICOT, V.; PRIMAULT, Y.; LAKEL, A.; SENGELIN, M.; BARILLON, B.; THOUAND, G.

Method for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. **Water Research**, vol. 49, p. 62-82, 2014. [dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.066](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.066)

KABAIVANOVA, L.; PETROVA, P.; HUBENOV, V.; SIMEONOV, I. Biogas Production Potential of Thermophilic Anaerobic Biodegradation of Organic Waste by a Microbial Consortium Identified with Metagenomics. **Life** 12, 702, 2022. <https://doi.org/10.3390/life12050702>

KARKI, R.; CHUENCHART, W.; SURENDRA, K. C.; SHRESTHA, S.; RASKIN, L.; SUNG, S.; HASHIMITO, A.; KHANAL, S. K. Anaerobic co-digestion: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, vol. 330, n. 125001, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125001>

KASINATH, A.; FUDALA-KSIAZEK, S.; SZOPINSKA, M.; BYLINSKI, H.; ARTICHOWICZ, W.; REMISZEWSKA-SKWAREK, A.; LUCZKIEWICZ, A. Biomass in biogas production: Pretreatment and codigestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 150, 1-20, 2021. doi.org/10.1016/j.rser.2021.111509

KEANOI, N.; HUSSARO, K.; TEEKASAP, S. Effect of with / without agitation of agricultural waste on biogas production from anaerobic co-digestion – A small scale. **American Journal of Environmental Science**, vol. 10, n. 1, p. 74-85, 2014. [doi:10.3844/ajessp.2014.74.85](https://doi.org/10.3844/ajessp.2014.74.85)

KOCH, K.; HAFNER, S. D.; WEINRICH, S.; ASTALS, S.; HOLLIGER, C. Power and Limitations of Biochemical Methane Potential (BMP) Tests. **Frontiers in Energy Research**, vol. 8, Article 63, 2020. [doi: 10.3389/fenrg.2020.00063](https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00063)

KROHN, C.; KHUDUR, L.; DIAS, D. A.; VAN DEN AKKER, B.; REES, C. A.; CROSBIE, N. D.; SURAPANENI, A.; O'CARROLL, D. M.; STUETZ, R. M.; BATSTONE, D. J.; BALL, A. S. The role of microbial ecology in improving the performance of anaerobic digestion of sewage sludge. **Frontiers in Microbiology**, vol. 13, 2022. doi.org/10.3389/fmicb.2022.1079136

KUMAR, S.; SMITH, S. R.; FOWLER, G.; VELIS, C.; KUMAR, S. J.; ARYA, S.; RENA; KUMAR, R.; CHEESEMAN, C. Challenges and opportunities associated with waste management in India. **Royal Society Open Science**, vol. 4, 2017. <https://doi.org/10.1098/rsos.160764>

KUMAR, A.; AGRAWAL, A. Recent trends in solid waste management status, challenges, and potential for the Indian cities – A review. **Current Research in Environmental Sustainability**, vol. 2, 2020. [http://dx.doi.org/10.1016/j.crsust.2020.100011](https://doi.org/10.1016/j.crsust.2020.100011)

LEITÃO, R. C.; BARCELLOS, W. M. **Produção de Biogás a Partir de Resíduos Orgânicos de Centrais de Abastecimento de Hortifrutigranjeiros**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2021.

LANGE, L. C.; SIMÕES, G. F.; FERREIRA, C. F. A.; SANTANA, D. W. E. A.; GARCIA, L. N. Estudo comparativo de metodologias empregadas para a análise de resíduos sólidos urbanos. In: AIDIS-Fe (Ed.) **Comparative Study of the Methodologies Employed for the Assessment of Urban Solid Waste** (In Portuguese). FEMISCA, Mexico City, 2002.

LANSING, S.; BOTERO, R. B.; MARTIN, J. F. Waste treatment and biogas quality in small-scale agricultural digesters. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 5881-5890, 2008.

LE, T-S.; NGUYEN, P-D.; NGO, H. H.; BUI, X-T.; DANG, B-T.; DIELS, L.; BUI, H-H.; NGUYEN, M-T.; QUANG, D-T. L. Two-stage anaerobic membrane bioreactor for co-treatment of food waste and kitchen wastewater for biogas production and nutrients recovery. *Chemosphere*, vol. 309, 2022. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136537

LEBIOCKA, M.; MONTUSIEWICZ, A.; CYDZIK-KWIATKOWSKA, A. Effect of Bioaugmentation on Biogas Yields and Kinetics in Anaerobic Digestion of Sewage Sludge. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 15, n. 1717, p. 1-16, 2018.

LEBUHN, M.; WEIB, S.; MUNK, B.; GUEBITZ, G. M. Microbiology and Molecular Biology Tools for Biogas Analysis, Diagnosis and Control. *In: Advances In Biochemical Engineering / Biotechnology*, 2015.

LE PERA, A.; SELLARO, M.; MIGLIORI, M.; BIANCO, M.; ZANARDI, G. Dry Mesophilic Anaerobic Digestion of Separately Collected Organic Fraction of Municipal Solid Waste: Two-Year Experience in an Industrial-Scale Plant. **Processes**, vol. 9, n. 213, p. 1-14, 2021. doi.org/10.3390/pr9020213

LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; PRASAD, S.; LOPES, W. S.; ATHAYDE JÚNIOR, G. B.; DANTAS, A. M. M. Tratamento de resíduos sólidos de centrais de abastecimento e feiras livres em reator anaeróbio de batelada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 2, p. 318-322, 2003.

LI, L.; PENG, X.; WANG, X.; WU, D. Anaerobic digestion of food waste: a review focused on process stability. **Bioresource Technology**, 248, p. 20-28, 2018. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.012

LIN, Y.; WU, S.; WANG, D. Hydrogen-methane production from pulp & paper sludge and food waste by mesophilic-thermophilic anaerobic co-digestion. **International Journal of Hydrogen Energy**, vol. 38, n. 35, p. 15055-15062, 2013. doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.051

LIN, L.; XU, F.; GE, X.; LI, Y. Improving the sustainability of organic waste management practices in the food-energy-water nexus: A comparative review of anaerobic digestion and composting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 89, p. 151-167, 2018. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.025

LIU, T.; SUN, L.; MÜLLER, B.; SCHNÜRER, A. Importance of inoculum source and initial community structure for biogas production from agricultural substrates. **Bioresource Technology**, vol. 245, p. 768-777, 2017. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.213

LOGAN, M.; VISVANATHAN, C. Management strategies for anaerobic digestate of organic fraction of municipal solid waste: Current status and future prospects. **Waste Management and Research**, vol. 37, n. 1, 27-39, 2019. https://doi.org/10.1177/0734242X18816793

MA, S.; WANG, H.; LI, J.; FU, Y.; ZHU, W. Methane production performances of different compositions in lignocellulosic biomass through anaerobic digestion. **Energy**, vol. 189, n. 116190, p. 1-7, 2019. doi.org/10.1016/j.energy.2019.116190

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Pearson-Prentice Hall. 10 ed. São Paulo. 2004.

MAHAT, S. B.; OMAR, R.; MAN, H. C.; IDRIS, A. I. M.; KAMAL, S. M. M.; IDRIS, A.; ANUAR, N. K. Influence of substrate to inoculum ratio (S/I) on the treatment performance of food processing wastewater containing high oil and grease (O&G) in batch mode. **Desalination and Water Treatment**, vol. 203, p. 267-278, 2020. doi: 10.5004/dwt.2020.26231

MALINOWSKY, C. **Sistema de metanização de resíduos sólidos orgânicos em duas fases**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 45, p. 540-555, 2015.

MARAGKAKI, A. E.; FOUNTOULAKIS, M.; GYPAKIS, A.; KYRIAKOU, A.; LASARIDI, K.; MANIOS, T. Pilot-scale anaerobic co-digestion of sewage sludge with agro-industrial by-products for increased biogas production of existing digesters at wastewater treatment plants. **Waste Management**, n. 59, p. 362-370, 2017.

MARDER, M.; BUCKER, F.; KONRAD, O.; MARCONATTO, L.; BORGES, L. G. A.; GIONGO, A.; GRANADA, C. E. Effect of the acclimated inoculant on improving the potential for biogas production at room temperature (~28°C) subjected to daily variations. **Journal of Cleaner Production**, vol. 292, p. 1-11, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125959

MARIANO, M. O. H.; MACIEL, F. J.; FUCALÉ, S. P.; JUCÁ, J. F. T.; BRITO, A. R. **Estudo da composição dos rsu do projeto piloto para recuperação do biogás do Aterro da Muribeca/PE**. VI Congresso Brasileiro de Geotecnia Ambiental – REGEO, Recife-PE, 2007.

MATA-ÁLVAREZ, J.; DOSTA, J.; ROMERO, M.; ALMANSA, X. F.; PECES, M.; ASTALS, S. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 36, p. 412-427, 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.039

MCCARTHY, N.; LEDESMA-AMARO, R. Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. **Trends in Biotechnology**, vol. 37, n. 2, 2019.

MEEGODA, J. N.; LI, B.; PATEL, K.; WANG, L. B. A Review of the Processes, Parameters, and optimization of Anaerobic Digestion. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 15, n. 2224, 1-16, 2018. doi:10.3390/ijerph15102224

MÉLO-SCHLUB, A. C.; SILVA, L. A. O.; HOLANDA, S. H. B.; FIRMO, A. L. B.; JUCÁ, J. F. T. Resíduos sólidos urbanos: potencial fonte de carbono para

degradação microbiana e produção de biogás. **Brazilian Journal of Development**, vol. 5, n. 8, p. 11927-11942, 2019.

MENZEL, T.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Role of Microbial Hydrolysis in Anaerobic Digestion. **Energies**, vol. 13, 2020. doi:10.3390/en13215555

MILLER, K. E.; GROSSMAN, E.; STUART, B. J.; DAVIS, S. C. Pilot-scale biogas production in a temperature climate using variable food waste. **Biomass and Bioenergy**, vol. 138, n. 105568, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105568>

MONTGOMERY, L. F. R.; BOCHMANN, G. **Pretreatment of Feedstock for Enhanced Biogas Production**. IEA Bioenergy, 2014.

MORALES-POLO, C.; CLEDERA-CASTRO, M. M.; SORIA, Y. M. Reviewing the Anaerobic Digestion of Food Waste: From Waste Generation and Anaerobic Process to Its Perspectives. **Applied Sciences**, vol. 8, n. 1804, 2018. doi:10.3390/app8101804

MOROZOVA, I.; NIKULINA, N.; OECHSNER, H.; KRÜMPEL, J.; LEMMER, A. Effects of Increasing Nitrogen Content on Process Stability and Reactor Performance in Anaerobic Digestion. **Energies**, vol. 13, n. 1139, p. 1-19, 2020. doi.org/10.3390/en13051139

MOTTA, I. G. B.; SANTANA, L. A. R.; PEREIRA, H. P.; PAULA, V. R.; MARTINS, M. F.; CARNEIRO, J. C.; OTÊNIO, M. H. Population Dynamics of Methanogenic Archaea in Co-Digestion Systems Operating Different Industrial Residues for Biogas Production. **Sustainability** 14, 11536, 2022. <https://doi.org/10.3390/su141811536>

NASCIMENTO, W. C. As Centrais Públicas de Abastecimento no Contexto da Globalização dos Alimentos. Entre as Mudanças na Forma de Atuação do Estado e o Fortalecimento dos Grandes Distribuidores: O Caso da CEASA-PE. Recife-PE. 223 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CFCH. Sociologia, 2008.

NÁTHIA-NEVES, G.; BERNI, M.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; FORSTER-CARNEIRO, T. Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2018.

NESHAT, S. A.; MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G. D.; LAHIJANI, P. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 79, p. 308-322, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.137

NIELFA, A.; CANO, R.; FDZ-POLANCO, M. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. **Biotechnology Reports** 5, p. 14-21, 2015.

NORAINI, M.; SANUSI, S. N. A.; ELHAM, O. S. J.; SUKOR, M. Z.; HAMID, K. H. K. Factors affecting production of biogas from organic solid waste via anaerobic digestion process: a review. **Solid State Science and Technology**, vol. 25, n. 1, p. 29-39, 2017.

NSAIR, A.; CINER, S. O.; ALASSALI, A.; QDAIS, H. A.; KUCHTA, K. Operational Parameters of Biogas Plants: A Review and Evaluation Study. **Energies**, vol. 13, n. 3761, p. 1-27, 2020. doi:10.3390/en13153761

NUANSAWAN, N.; CHIEMCHASRI, C.; CHIEMCHASRI, W.; SHODA, M. Treatment of concentrated leachate with low greenhouse gas emission in two-stage membrane bioreactor bio-augmented with *Alcaligenes faecalis* n. 4. **Journal of the Air & Waste Management Association**, n. 68, vol. 12, p. 1378-1390, 2018. DOI: 10.1080/10962247.2018.1516701

OBAIDEEN, K.; ABDELKAREEN, M. A.; WILBERFORCE, T.; ELSAID, K.; SAYED, E. T.; MAGHRABIE, H. M.; OLABI, A. G. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 131, 104207, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2022.104207>.

OLIVEIRA, L. R. G.; SANTOS FILHO, D. A.; VASCONCELOS, K. C.; LUCENA, T. V.; JUCÁ, J. F. T.; SANTOS, A. F. S. Methanization potential of anaerobic biodigestion of solid food waste. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 22, n. 1, p. 69-73, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p69-73>

OLIVEIRA, L. R. G.; SANTOS FILHO, D. A.; FRAGA, T. J. M.; JUCÁ, J. F. T.; MOTTA SOBRINHO, M. A. Kinetics assessment and modeling of biogas production by anaerobic digestion of food waste and acclimated sewage sludge. **Journal of Material Cycle and Waste Management**, vol. 23, n. 4, p. 1-11, 2021.

OWEN, W. F.; STUCKEY, D. C.; HEALY JR., J. B.; YOUNG, L. Y.; MCCARTY, P. L. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. **Water Research**, vol. 13, p. 485-492, 1979.

PADILHA, J. L.; MESQUITA, A. L. M. Waste-to-energy effect in municipal solid waste treatment for small cities in Brazil. **Energy Conversion and Management** 265, 115743, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.115743>

PANIGRAHI, S.; DUBEY, B. K. A critical review on operating parameters and strategies to improve the biogas yield from anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Renewable Energy**, vol. 143, p. 779-797, 2019. doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.040

PARITOSH, K.; YADAV, M.; MATHUR, S.; BALAN, V.; LIAO, W.; PAREEK, N.; VIVEKANAND, V. Organic Fraction of Municipal Solid Waste: Overview of Treatment Methodologies to Enhance Anaerobic Biodegradability. **Frontiers in Energy Research**, vol. 6, 2018.

PARRA-OROBIO, B. A.; TORRES-LOZADA, P.; MARMOLEJO-REBELLÓN, L. F. Anaerobic digestion of municipal biowaste for the production of renewable energy: effect of particle size. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 34, n. 2, p. 481-491, 2017. <dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150331>

PETERZ, M. E. G. Temperature in agar plates and its influence on the results of quantitative microbiological food analyses. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 14, Issue 1, p. 59-66, 1991. doi.org/10.1016/0168-1605(91)90037-P

PHAN VAN, D.; FUJIWARA, T.; LEU THO, B.; SONG TOAN, HOANG MINH, G. A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: Configurations, operating parameters, and current trends. **Environmental Engineering Research**, vol. 25, n. 1, p. 1-17, 2020. <https://doi.org/10.4491/eer.2018.334>

PILARSKI, K.; PILARSKA, A. A.; BONIECKI, P.; NIEDBALA, G.; DURCZAK, K.; WITASZEK, K.; MIODUSZEWSKA, N.; KOWALIK, I. The Efficiency of Industrial and Laboratory Anaerobic Digesters of Organic Substrates: The Use of The Biochemical Methane Potential Correction Coefficient. **Energies**, vol. 13, n. 1280, p. 1-13, 2020.

PÖSCHL, M.; WARD, S.; OWENDE, P. Evaluation of energy efficiency of various biogas production and utilization pathways. **Applied Energy**, vol. 87, p. 3305-3321. doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.05.011

POSMANIK, R.; KIM, A. H.; LABATUT, R. A.; USACK, J. G.; ANGENENT, L. T. Granular sludge is a preferable inoculum for the biochemical methane potential assay for two complex substrates. **Bioresource Technology**, vol. 309, n. 123359, p. 1-5, 2020. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123359

RABII, A.; ALDIN, S.; DAHMAN, Y.; ELBESHBISHY, E. A Review on Anaerobic Co-Digestion with a Focus on the Microbial Populations and the Effect of Multi-Stage Digester Configuration. **Energies**, vol. 12, n. 1106, p. 1-25, 2019. [doi:10.3390/en12061106](https://doi.org/10.3390/en12061106)

RAJPUT, A. A.; SHEIKH, Z. Effect of inoculum type and organic loading on biogas production of sunflower meal and wheat straw. **Sustainable Environmental Research**, vol. 29, n. 4, p. 1-10, 2019. doi.org/10.1186/s42834-019-0003-x

RAM, C.; KUMAR, A.; RANI, P. Municipal Solid Waste Management: A Review of Waste to Energy (WtE) Approaches. **BioResources**, vol. 16, n. 2, 2021.

RAMOS, T. R. R. **Resíduos sólidos nas centrais de abastecimento de hortifrutigranjeiros sob a ótica da produção mais limpa: o caso da CEASAMinas Uberlândia**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2017. 129f.

RAMOS-SUAREZ, M.; ZHANG, Y.; OUTRAM, V. Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** 20:439-478, 2021.

RANA, R.; NANDA, S.; MEDA, V.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. A Review of Lignina Chemistry and its Biorefining Conversion Technologies. **Journal of Biochemical Engineering & Bioprocess Technology** 1:2, 2018.

RAPOSO, F.; FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V.; DE LA RUBIA, M. A.; BORJA, R.; BÉLINE, F.; CAVINATO, C.; DEMIRER, G.; FERNÁNDEZ, M.; FERNÁNDEZ-POLANCO, M.; FRIGON, J. C.; GANESH, R.; KAPARAJU, P.; KOUBOVA, J.; MÉNDEZ, R.; MENIN, G.; PEENE, A.; SCHERER, P.; TORRIJOS, M.; UELLEND AHL, H.; WIERINCK, I. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an

international interlaboratory. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 86, Issue 8, p. 1088-1098, 2011. doi.org/10.1002/jctb.2622

REUSCHENBACH, P.; PAGGA, U.; STROTTMANN, U. A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. **Water Research**, vol. 37, p. 1571-1582, 2003. doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00528-6

ROSE, S. B.; MÜLLER, R. E. Studies with the agar cup-plate methods. I. A standardized agar cup-plate technique. **Journal of Bacteriology**, n. 38, vol. 5, p. 525-537, 1939.

RUSIN, J.; CHAMRADOVA, K.; GRÝCOVA, B. The influence of biomass agitation on biogas and methane production using the high-solids thermophilic anaerobic digestion. **Green Processing and Synthesis**, vol. 6, p. 273-279, 2017. DOI 10.1515/gps-2016-0181

SACHDEVA, L. D.; BARDHAN, P. N. Bacteriological study of an *Alcaligenes faecalis* strain: a food poisoning epidemic. **Indian Journal of Pathology and Bacteriology**, vol. 37, p. 128-133, 1963.

SAILER, G.; SILBERHORN, M.; EICHERMÜLLER, J.; POETSCH, J.; PELZ, S. K.; OECHSNER, H.; MÜLLER, J. Influence of Digester Temperature on Methane Yield of Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW). **Applied Sciences**, vol. 11, n. 7, p. 1-21, 2021. DOI: 10.3390/app11072907

SANTOS, L. A.; VALENÇA, R. B.; SILVA, L. C. S.; HOLANDA, S. H. B.; SILVA, A. F. V.; JUCÁ, J. F. T.; SANTOS, A. F. M. S. Methane generation potential through anaerobic digestion of fruit waste. **Journal of Cleaner Production**, vol. 256, p. 1-10, 2020. doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120389

SANTOS, A. D.; SILVA, J. R.; CASTRO, L. M.; QUINTA-FERREIRA, R. M. A biochemical methane potential of pig slurry. **Energy Reports** 8, 153-158, 2022. https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.01.127

SANTOS FILHO, D. A. **Estudo da influência de inóculos e desenvolvimento de reator horizontal no processo de biodigestão de resíduo sólido orgânico**. 113 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal de Pernambuco. 2018.

SANTOS FILHO, D. A.; OLIVEIRA, L. R. G.; FRAGA, T. J. M.; MOTTA SOBRINHO, M. A. M.; JUCÁ, J. F. T. Development of a horizontal reactor with radial agitation to synthesize bio-methane from biomass waste and domestic sewage sludge. **Journal of Cleaner Production**, vol. 257, 2020. doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120616

SANTOS FILHO, D. A.; OLIVEIRA, L. R. G.; PENTEADO, M. C. P.; SCHIRMER, W. N.; MOTTA SOBRINHO, M. A.; JUCÁ, J. F. T. Energy sustainability of supply centers from the codigestion of organic waste. **Detritus**, vol. 9, p. 76-82, 2020. DOI 10.31025/2611-4135/2020.13901

SARA, A.; SANTRA, S. C. Isolation and characterization of bacteria isolated from municipal solid waste for production of industrial enzymes and waste degradation. **Journal of Microbiology and Experimentation**, vol. 1, Issue 1, p. 12-19, 2014. DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00003

SEGURA-SALAZAR, J.; TAVARES, L. M. Sustainability in the Minerals Industry: Seeking a Consensus on Its Meaning. **Sustainability** 10, 1429, 2018.

SCHIRMER, W. N.; JUCÁ, J. F. T.; SCHULER, A. R. P.; HOLANDA, S.; JESUS, L. L. Methane production in anaerobic digestion of organic waste from Recife (Brazil) landfill: evaluation in refuse of different ages. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 31, n. 2, p. 373-384, 2014.

SERRANO-MEZA, A.; GARZÓN-ZÚÑIGA, M. A.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; ESTRADA-ARRIAGA, E. B.; ALMARAZ-ABARCA, N.; GARCÍA-OLIVARES, J. G. Anaerobic digestion inhibition indicators and control strategies in processes treating industrial wastewater and waste. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, vol. 19, n. 1, p. 29-44, 2020. <https://doi.org/10.24275/rmiq/IA1221>

SERUGA, P.; KRZYWONOS, M. Separate Collected Versus Mechanical Segregated Organic Fractions in Terms of Fertilizers Suitability. **Energies**, vol. 14, p. 1-10, 2021. doi.org/10.3390/en14133971

SEVINC, N.; DEMIRKAN, E. Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, vol. 5, n. 14, p. 95-103, 2011.

SILVESTRE, G.; RODRÍGUES-ABALDE, A.; FERNÁNDEZ, B.; FLOTATS, X.; BONMATÍ, A. Biomass adaptation over anaerobic co-digestion of sewage sludge with trapped grease waste. **Bioresource Technology**, n. 102, p. 6830-6836.

Sistema Nacional de Informações sobre a Gestão dos Resíduos Sólidos – SINIR. **Resíduos Sólidos Urbanos: Composição Gravimétrica dos Resíduos Sólidos Urbanos**. 2020. Disponível em: <https://sinir.gov.br/informacoes/tipos-de-residuos/residuos-solidos-urbanos/>. Acesso em: 31 Jan. 2023.

SHIN, D.-C.; KIM, I.-T.; JUNG, J.; JEONG, Y.; LEE, Y.-E.; AHN, K.-H. Increasing Anaerobic Digestion Efficiency Using Food-Waste-Based Biochar. **Fermentation** 8, 282, 2022.

STEINMETZ, R. L. R.; MEZZARI, M. P.; SILVA, M. L. B.; KUNZ, A.; AMARAL, A. C.; TÁPPARO, D. C.; SOARES, H. M. Enrichment, and acclimation of an anaerobic mesophilic microorganism's inoculum for standardization of BMP assays. **Bioresource Technology**, vol. 219, p. 21-28, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.031>

STRANGE, O.; ÁCS, N.; WIRTH, R.; MARÓTI, G.; BAGI, Z.; RÁKHELY, G.; KOVÁCS, K. L. Bioaugmentation of the thermophilic anaerobic biodegradation of cellulose and corn stover. **Anaerobe**, n 46, p. 104-113, 2017.

SU, Y.; LIU, C.; FANG, H.; ZHANG, D. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial Cell Factories**, vol. 19, n. 173, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>

SUKPHUN, P.; SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Volatile Fatty Acid Production from Organic Waste with the Emphasis on Membrane-Based Recovery. **Fermentation**, vol. 7 (3), 159, p. 1-23, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030159>.

SUSMITHA, V.; RAGHUNANDANAN, V. R.; FRANCIS, M. M. Effectiveness of bacterial inoculum as partial substitute for cow dung in the installation and stabilization of biogas plant. **Indian Journal of Microbiology Research**, vol. 6, n. 4, p. 313-316, 2019. <https://doi.org/10.18231/j.ijmr.2019.067>

TENA, D.; FERNÁNDEZ, C.; LAGO, M. R. *Alcaligenes faecalis*: an Unusual Cause of Skin and Soft Tissue Infection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, vol. 68, n. 2, p. 128-130, 2015.

WILTSCHI, B.; CERNAVA, T.; DENNIG, A.; CASAS, M. G.; GEIER, M.; GRUBER,.; HABERBAUER, M.; HEIDINGER, P.; ACERO, E. H.; KRATZER, R.; LULEY-GOEDL, C.; MÜLER, C. A.; PITZER, J.; RIBITSCH, D.; SAUER, M.; SCHMÖLZER, K.; SCHNITZHOFFER, W.; SENSEN, C. W.; SOH, J.; STEINER, K.; WINKLER, C. K.; WINKLER, M.; WRIESSNEGGER, T. Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. **Biotechnology Advances** 40, 107520, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107520>

USEPA - US Environmental Protection Agency (1991) EPA-450/3-90-011a. **Air emissions from municipal solid waste landfills - Background information for proposed standards and guidelines**. 543p.

VALECHA, A. Microorganisms in the Anaerobic Digestion. **International Journal of Engineering Research & Technology**, vol. 10, Issue 11, November-2021.

VENKITESHWARAN, K.; BOCKER, B.; MAKI, J.; ZITOMER, D. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function. **Microbiology Insights**, vol. 8, 2015. doi:10.4137/MBI.S33593

VESHAREH, M. J.; AZAD, E. G.; DEIHIMI, T.; NIAZI, A.; AYATOLLAHI, S. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactants characterization, production optimization and wetting effect on carbonates surfaces. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technologies**, vol. 9, p. 233-245, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13202-018-0457-0>

VIJAYADEEP, C.; SASTRY, P. S. Effect of Heavy Metal Uptake by *E. coli* and *Bacillus* spp. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, vol. 5, n. 5, p. 1-3, 2014. DOI: 10.4172/2155-6199.1000238

WANG, N.; ZHENG, T.; MA, Y. New insights into the co-locating concept on synergistic co-digestion of sewage sludge and food waste towards energy self-sufficient in future WWTPs. *Bioresource Technology Reports*, n. 10, 2020.

WANG, X.; SU, R.; CHEN, K.; XU, S.; FENG, J.; OUYANG, P. Engineering a Microbial Consortium Based Whole-Cell System for Efficient Production of Glutarate From L-Lysine. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, Article 341, p. 1-10, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00341

WANG, S.; XU, C.; SONG, L.; ZHANG, J. Anaerobic Digestion of Food Waste and Its Microbial Consortia: A Historical Review and Future Perspectives. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 19, 9519, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijerph19159519>

WEINRICH, S.; NELLES, M. *Basics of Anaerobic Digestion – Biochemical Conversion and Process Modelling*. (DBFZ-Report, 40). Leipzig: DBFZ. VIII, 9-76 S. ISBN: 978-3-946629-72-6.

XIAO, X.; ZHANG, R.; HE, Y.; LI, Y.; FENG, L.; CHEN, C.; LIU, G. Influence of particle size and pretreatment on the anaerobic digestion of corn stover. **Bioresources**, vol. 8, n. 4, p. 5850-5860, 2013.

XIE, S.; HIGGINS, M. J.; BUSTAMANTE, H.; GALWAY, B.; NGHIEM, L. D. Current status and perspectives on anaerobic co-digestion and associated downstream processes. **Environmental Science: Water Resources and Technology**, vol. 4, p. 1759-1770, 2018a.

YADVIKA; SANTOSH; SREEKRISHNAN, T. R.; KOHLI, S.; RANA, V. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review. **Bioresource Technology**, vol. 95, Issue 1, p. 1-10, 2004. doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.010

YAHIA, E. M.; FONSECA, J. M.; KITINOJA, L. Postharvest losses and waste. In: **Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 43-69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813276-0.00002-X>.

YANGIN-GOMEZ, C.; SAPMAZ, T.; AYDIN, S. Impact of inoculum acclimation on energy recovery and investigation of microbial community changes during anaerobic digestion of the chicken manure. **Environmental Technology**, vol. 41, n. 1, p. 49-58, 2020. doi.org/10.1080/09593330.2018.1551434

ZHANG, J.; LI, W.; LEE, J.; LOH, K.-C.; DAI, Y.; TONG, Y. W. Enhancement of biogas production in anaerobic co-digestion of food waste and waste activated sludge by biological co-pretreatment. **Energy** 137, 479-486, 2017.

ZHANG, P.; CHEN, Y.; ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. **Water Research**, vol. 43, p. 3735-3742, 2009.

ZHANG, X.; LIU, C.; CHEN, Y.; ZHENG, G.; CHEN, Y. Source separation, transportation, pretreatment, and valorization of municipal solid waste: a critical review. **Environment, Development and Sustainability** 24, p. 11471-11513, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10668-021-01932-w>

ZUPANCIC, M.; MOZIC, V.; MOZE, M.; CIMERMAN, F.; GOLOBIC, I. Current Status and Review of Waste-to-Biogas Conversion for Selected European Countries and Worldwide. **Sustainability** 14, 1823, 2022. <https://doi.org/10.3390/su14031823>