



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Ciências e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Mariana Erthal Rocha

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR
MICROBIANA E SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DA PRODUÇÃO
DE BIOGÁS A PARTIR DE LODO DE ETE**

Rio de Janeiro

2024

Mariana Erthal Rocha

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR MICROBIANA E
SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS DE LODO DE
ETE**

Tese de doutorado apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Curso de Doutorado em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.



Orientadora: Prof. Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira

Coorientadores: Prof. Norberto Mangiavacchi

Prof. Marcia Marques Gomes

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

R672 Rocha, Mariana Erthal.
Caracterização da diversidade molecular microbiana e simulação
computacional da produção de biogás a partir de lodo de ETE / Mariana
Erthal Rocha. – 2024.
228 f.

Orientadora: Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira.
Coorientadores: Norberto Mangiavacchi, Marcia Marques Gomes.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Biogás - Teses. 3. Águas residuais -
Microbiologia - Teses. 4. Lodo residual - Teses. 5. Água - Estações de
tratamento - Teses. I. Teixeira, Lia Cardoso Rocha Saraiva. II.
Mangiavacchi, Norberto. III. Gomes, Marcia Marques. IV. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. V. Título.

CDU 628.32:662.767.2

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,
desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mariana Erthal Rocha

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR MICROBIANA E
SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS DE LODO DE
ETE**

Tese de doutorado apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Curso de Doutorado em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em 07 de maio de 2024.

Banca Examinadora:

Prof. Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira (Orientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Norberto Mangiavacchi (Coorientador)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Marcia Marques Gomes (Coorientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Cristina Rossi Nakayama
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof. Alex Enrich-Prast
Linköping University

Prof. Gilberto de Jesús Colina Andrade
Universidad Católica de Santa María - UCSM

Paulo Afonso de Almeida
Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro - CEDAE

Prof. André Luís de Sá Salomão
Faculdade de Engenharia - UERJ

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Ao meu filho, Henrique.
Aos meus orientadores Lia, Marcia e Norberto.

AGRADECIMENTOS

A escrita de uma tese e todos os processos nela envolvidos são um caminho solitário e visceral. Entre desafios, dúvidas e descobertas, cada etapa exige dedicação e resistência. No entanto, ao final desse percurso árduo, algo novo floresce - como se, depois de tanto esforço, brotasse uma flor, e o caminho começasse a revelar sua beleza.

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida acadêmica e de alguma forma despertaram em mim a curiosidade científica.

Aos meus orientadores, Lia, Marcia e Norberto pelo apoio e força. Lia, obrigada pelas conversas e pela parceria. Marcia, obrigada pelo direcionamento e competência. Norberto, obrigada por acreditar em mim, nas minhas idéias, por me permitir realizar os experimentos no laboratório e toda a bagunça nele envolvida. Nesta tese existe um pedacinho de cada um de vocês. Nos momentos em que eu pensei que não iria conseguir, cada um, a sua maneira me estendeu a mão.

Agradeço a toda a equipe do Gesar, sempre carinhosa e vibrante quando os infundáveis experimentos davam certo. Professor Pontes, pelas ótimas conversas, pelos livros e discussões científicas. Sonia, pelo carinho, pelas orações e por existir no Gesar. Jorge, obrigada por todo o apoio operacional, instalações e ajustes. Thais, eu sou muito grata por ter trabalhado contigo durante o doutoramento e por ter te conhecido. Rachel, obrigada pelas conversas, pelas risadas e pelo apoio amigo sempre. Ygor, obrigada pelo sistema Arduíno e tudo mais envolvendo TI. Gabriel, obrigada pelas conversas sobre ADM1. A todos os demais integrantes do Gesar, obrigada!

À equipe do Labifi que me acolheu e sempre me ajudou em tudo o que precisei, o meu muito obrigada! Wanda, Tadeu, Camila, Marina vocês moram no meu coração.

Ao professor Dr. Alex Enrich-Prast (LIU), o qual me proporcionou umas das melhores experiências profissionais que vivenciei. À Thuane, a colega de trabalho que virou amiga na Suécia.

À Fapesp e aos professores Dra. Vivian Helena Pellizari (IOUSP), Dra. Cristina Rossi Nakayama (UNIFESP), Dra. Antje Boetius (Max Planck Institute), Dr. Brendan Bohannon (UO) que participaram do Advanced School of Methane Science. Ao Dr. Rubens Callegari, que se tornou meu amigo.

À equipe do LABEM - Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental da UFRJ. Em especial ao Dr. Douglas Monteiro e Dr. Caio Rachid.

À Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón-Lins (UNIMICRO), em especial a Profa. Dra. Fernanda Abreu e ao Dr. Jefferson Cypriano.

Ao Laboratório de Biocatálise do INT – Instituto Nacional de Tecnologia. Em especial às profas. Dra. Viridiana Leitão e Dra. Mariana Faber.

À Rede Ipes de biogás e sustentabilidade Brasil Suécia, que se formou durante o meu doutoramento, em especial a todos os professores e alunos envolvidos.

À Rede Iberoamericana Amaru de saneamento e água. Criada durante a pandemia Covid-19. Agradeço a todos os professores e alunos.

À Companhia Estadual de Saneamento e Águas – CEDAE. Em especial aos Srs. Dr. Paulo Afonso de Almeida, Sr. Wilton Lemos dos Passos e ao Sr. Dr. Miguel Freitas Cunha.

À InovUerj Qualitec, Faperj, Capes, CNPq e FINEP. À profa. Dra. Simone Vendramel (IFRJ) e ao prof. Dr. Geraldo Lippel (UFRJ). Ao Dr. Newton Magalhães do Depto. de Geografia da UERJ.

À minha família. Aos meus pais, Anna e Josemar. À minha irmã, Silvia. Ao meu filho, Henrique. Aos meus afilhados João e Helena. À Glória, minha sogra e ao Guilherme, meu esposo.

ॐ लोकाः समस्ताः सुखिनो भवन्तु।

Om Lokah Samastah Sukhino Bhavantu

Que todos os seres em todos os lugares sejam felizes e livres,
e que os pensamentos, palavras e ações da minha própria vida
contribuam de alguma forma para a felicidade e liberdade de todos.

RESUMO

ROCHA, Mariana Erthal. *Caracterização da diversidade molecular microbiana e simulação computacional da produção de biogás a partir de lodo de ETE*. 2024. 228 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A digestão anaeróbia (DA) é um processo biológico eficaz para o tratamento de diferentes tipos de resíduos orgânicos e produção de energia na forma de biogás. Bactérias e Archaea formam consórcios microbianos, tendo como produto, o gás metano (CH₄). A DA e a estabilidade na formação do biogás, fundamentais para a operação de um reator, ainda não são totalmente compreendidas. Identificar os microrganismos (MO) envolvidos no processo permite conhecer o potencial metabólico do sistema em questão. Na presente investigação, o Modelo de Digestão Anaeróbia nº 1 (ADM1) foi utilizado para simular a produção de CH₄ em um reator anaeróbio (RA), e um ensaio associado de potencial bioquímico de metano (BMP) em escala de bancada, foi conduzido tendo lodo de esgoto (LE) da estação municipal de tratamento de esgotos (ETE) Alegria/RJ como matéria-prima. O LE apresentou as seguintes características físico-químicas: pH (7,4 - 7,6), alcalinidade (2.382 ± 100 mg CaCO₃ L⁻¹), tDQO (21.903 ± 1000 mg L⁻¹), COT (895 ± 100 mg L⁻¹), ST, STV e SSV (2,0%, 1,1% e 0,8%, respectivamente). O ensaio de BMP foi realizado em seis réplicas sob condições mesófilas anaeróbias (37 ± 0,1°C) por 11 dias com rendimento de CH₄ de 137,6 ± 6,39 NmL CH₄ ou 124 ± 6,72 CH₄ g⁻¹ VS⁻¹. Ao comparar os resultados obtidos no BMP com os dados gerados pelo modelo computacional ADM1, foram obtidas curvas de produção cumulativa de CH₄ semelhantes, indicando a calibração e a validação do modelo ADM1. Utilizando a plataforma Illumina MiSeq, o sequenciamento do gene 16S RNAr revelou uma comunidade bacteriana central no material sólido, apresentando variações notáveis nos perfis. Antes da DA, a abundância relativa no LE era composta por: *Proteobacteria* > *Bacteroidota* > *Actinobacteriota*. Pós-DA, a abundância relativa mudou para *Firmicutes* > *Synergistota* > *Proteobacteria*, com *Sporanaerobacter* e *Clostridium* emergindo como gêneros dominantes. A comunidade metanogênica passou por uma mudança na via metabólica de acetoclástica para hidrogenotrófica nos reatores em escala de laboratório. No nível de gênero, *Methanosaeta*, *Methanolinea* e *Methanofastidiosum* predominaram inicialmente, enquanto pós-DA, *Methanobacterium*, *Methanosaeta* e *Methanospirillum* tiveram precedência. Esta transição metabólica pode estar ligada ao aumento da abundância de *Firmicutes*, particularmente *Clostridia*, que abrigam bactérias oxidantes de acetato (CH₃COO) facilitando a conversão de acetato em hidrogênio (H₂). *Firmicutes* foi o filo dominante durante a DA, seguido por *Synergistota*. *Sporanaerobacter* e *Clostridium* foram os gêneros dominantes nos reatores BMP. A mudança da comunidade de arqueas metanogênicas de *Methanosaeta* para *Methanobacterium* pode estar relacionada ao aumento do filo *Firmicutes* e *Synergistota* nos reatores, afetando o grau de fermentação do substrato, o qual contém bactérias oxidantes de acetato, as quais convertem acetato em H₂ que é eliminado pelos metanogênicos, tornando a reação termodinamicamente possível para esses grupos. Os perfis microbianos observados no presente estudo ampliam o conhecimento atual sobre possíveis relações sintróficas entre bactérias produtoras de H₂ e arqueias metanogênicas hidrogenotróficas em LE. Os resultados obtidos ajudam a vislumbrar novos horizontes para futuros estudos de ecologia microbiana e melhoria da produção de biogás em ETEs.

Palavras-chave: Bioenergia; digestão anaeróbia; biogás metano; ADM1; RNAr 16S; archaea; lodo de esgoto.

ABSTRACT

ROCHA, Mariana Erthal. *Characterization of microbial molecular diversity and optimization of biogas production from large-scale WWTP sludge*. 2024. 228 p. Thesis (Doctor Degree in Sanitary and Environmental Engineering) - Engineer Faculty, University of the Estate of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Anaerobic digestion (AD) is an effective biological process for treating various types of organic waste and producing energy in the form of biogas. Bacteria and Archaea form microbial consortia, with methane gas (CH₄) as the product. AD and the stability in biogas formation, crucial for reactor operation, are not yet fully understood. Identifying the microorganisms (MO) involved in the process allows understanding the system's metabolic potential. In this investigation, Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) was used to simulate CH₄ production in an anaerobic reactor (RA), and an associated Biochemical Methane Potential (BMP) assay on a bench scale was conducted using sewage sludge (SS) from Alegria/RJ municipal wastewater treatment plant (WWTP) as the raw material. The SS presented the following physicochemical characteristics: pH (7.4 - 7.6), alkalinity (2,382 ± 100 mg CaCO₃ L⁻¹), tCOD (21,903 ± 1000 mg L⁻¹), COT (895 ± 100 mg L⁻¹), ST, STV, and SSV (2.0%, 1.1%, and 0.8%, respectively). The BMP assay was performed in six replicates under mesophilic anaerobic conditions (37 ± 0.1°C) for 11 days with CH₄ yield of 137.6 ± 6.39 NmL CH₄ or 124 ± 6.72 CH₄ g⁻¹ VS⁻¹. By comparing the results obtained in BMP with the data generated by computational model ADM1, similar cumulative CH₄ production curves were obtained, indicating the calibration and validation of ADM1 model. Using Illumina MiSeq platform, 16S rRNA gene sequencing revealed a core bacterial community in the solid material, showing notable variations in profiles. Before AD, the relative abundance in SS was composed of: *Proteobacteria* > *Bacteroidota* > *Actinobacteriota*. Post-AD, the relative abundance changed to *Firmicutes* > *Synergistota* > *Proteobacteria*, with *Sporanaerobacter* and *Clostridium* emerging as dominant genera. The methanogenic community underwent a shift from acetoclastic to hydrogenotrophic metabolic pathway in the laboratory-scale reactors. At the genus level, *Methanosaeta*, *Methanolinea*, and *Methanofastidiosum* initially predominated, while post-AD, *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, and *Methanospirillum* took precedence. This metabolic transition may be linked to the increased abundance of *Firmicutes*, particularly *Clostridia*, harboring acetate-oxidizing bacteria facilitating acetate conversion into hydrogen. *Firmicutes* was the dominant phylum during AD, followed by *Synergistota*. *Sporanaerobacter* and *Clostridium* were dominant genera in BMP reactors. The change from *Methanosaeta* to *Methanobacterium* in the methanogenic archaeal community may be related to increased *Firmicutes* and *Synergistota* phyla in the reactors, affecting the degree of substrate fermentation, which contains acetate-oxidizing bacteria converting acetate into H₂ eliminated by methanogens, making the reaction thermodynamically feasible for these groups. The microbial profiles observed in this study expand the current knowledge on potential syntrophic relationships between H₂-producing bacteria and hydrogenotrophic methanogenic archaea in SS. The results obtained help envision new horizons for future studies of microbial ecology and improvement of biogas production in WWTPs.

Keywords: Bioenergy; anaerobic digestion; biogas methane; ADM1; 16S rRNA; archaea; sewage sludge.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da tese
- Figura 2. Transição energética global
- Figura 3. Substituição de energia primária mundial
- Figura 4. Modelo esquemático de produção do biogás
- Figura 5. O modelo de economia circular
- Figura 6. Lacuna de circularidade, capital natural, serviços ecossistêmicos e a indústria emergente da bioenergia
- Figura 7. As 17 metas para o Desenvolvimento Urbano Sustentável da Agenda 2030 da ONU
- Figura 8: Mapa das plantas de biogás no Brasil (agropecuária, indústria, RSU, esgoto)
- Figura 9. Evolução do setor de biogás no Brasil (agropecuária, indústria, RSU, esgoto)
- Figura 10. Mapa das plantas de biogás no Brasil (RSU, esgoto)
- Figura 11. Evolução do setor de biogás no Brasil (RSU e esgoto)
- Figura 12. Produção de biogás por ano nos países membros AIE 2020
- Figura 13. Distribuição das usinas de biogás reportadas para IEA
- Figura 14. Conversão biológica nos sistemas aeróbios e anaeróbios
- Figura 15. Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia
- Figura 16. Modelo esquemático protocolo BMP
- Figura 17. Gráfico hipotético para a produção de metano em dias
- Figura 18. Esquema de um típico digestor de tanque simples utilizado como base no modelo ADM1
- Figura 19. Etapas do processo no modelo ADM1
- Figura 20. Representação gráfica do modelo cinético de Monod
- Figura 21. Os três domínios da vida
- Figura 22. Fluxograma da metodologia de pesquisa
- Figura 23. Localização das ETEs e suas bacias de esgotamento
- Figura 24. Planta ETE Alegria, Caju
- Figura 25. Planta ETE Alegria, Caju
- Figura 26. Vista esquemática da planta de operação ETE Alegria
- Figura 27. Reatores anaeróbios ETE Alegria, Caju

- Figura 28a. Ponto de coleta de lodo de esgoto anaeróbico na ETE Alegria, Cedae
- Figura 28b. Bocal de saída do lodo anaeróbico
- Figura 28c. Amostra do lodo coletado
- Figura 29a. Análise de alcalinidade
- Figura 29b. Lodo de esgoto nas garrafas digestoras
- Figura 29c. Análise de série de sólidos
- Figura 29d. Análise de carbono orgânico total
- Figura 29e. Análise de demanda química de oxigênio
- Figura 30. Diagrama esquemático do aparelho BMP usado no ensaio de BMP
- Figura 31a. Montagem dos experimentos BMP em laboratório: Inserção das válvulas de 3 vias nas rolhas de silicone para vedar as garrafas de borossilicato
- Figura 31b. Montagem das garrafas de BMP com as mangueiras de 1 polegada
- Figura 32. Estanqueamento do sistema com bomba peristáltica e Arduino
- Figura 33a. Prototipagem eletrônica em sistema Arduino. gerada no sistema digestor
- Figura 33b. Dispositivo mecânico para controle da pressão
- Figura 34a. Experimento BMP em operação no banho termostático
- Figura 34b. Válvulas e conectores no sistema BMP
- Figura 35. Abordagem metodológica: ensaio combinado BMP - modelo ADM1
- Figura 36a. Amostra de lodo de esgoto congelada em tubo Falcon
- Figura 36b. Amostras de lodo de esgoto congeladas em tubos Falcon
- Figura 37. Amostra do lodo de esgoto coletado na ETE – Alegria, RJ
- Figura 38. Extração de amostras de DNA no Laboratório Labifi/Uerj
- Figura 39. Gel de agarose para verificação da integridade do DNA extraído mostrando bandas claras e fortes
- Figura 40. Sequenciamento no sistema Illumina Miseq
- Figura 41. Sequência de etapas realizadas para estudar a diversidade microbiana nos reatores
- Figura 42. Diagrama de fluxo de itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises (PRISMA)
- Figura 43. Plotagem do Teste-T pareado
- Figura 44. Comparação da produção média de CH₄ a diferentes temperaturas. Valor médio de CH₄ obtido em triplicatas.
- Figura 45. Comparação da produção de metano sob diferentes condições de armazenamento

- Figura 46. Produção acumulada de metano em seis réplicas experimentais R1 - R6
- Figura 47. Rendimento da produção de metano R1 ao R6
- Figura 48. Curva metanogênica ensaio experimental BMP versus simulação ADM1
- Figura 49. Curvas de concentração de Xc, SI e XI obtidas com a simulação computacional do AR usando a implementação atual do modelo DAE-ADM1
- Figura 50. Curvas de concentração de Xch, Xpr e Xli obtidas com a simulação computacional do AR usando a implementação atual do modelo DAE-ADM1
- Figura 51. Curvas de concentração de Xsu, Xaa e Xfa obtidas com a simulação computacional do AR usando a implementação atual do modelo DAE-ADM1
- Figura 52. Curvas de concentração de Xc4, Xpro e Xac obtidas com a simulação computacional do AR usando a implementação atual do modelo DAE-ADM1
- Figura 53. Curvas de concentração de Ssu, Saa e Sfa obtidas com a simulação computacional do AR usando a implementação atual do modelo DAE-ADM1
- Figura 54. A otimização da curva de produção de CH₄ considerando um modelo simples de mistura/estratificação
- Figura 55. Abundância relativa da comunidade microbiana
- Figura 56. *Heatmap* das variações do filo bacteriano.
- Figura 57. Resultado para as análises RNAr 16S em OTUs
- Figura 58. Diagrama de cordas do filo bacteriano
- Figura 59. Abundância relativa da comunidade microbiana por gênero
- Figura 60. *Heatmap* do gênero microbiano por OTU
- Figura 61. Abundância relativa da comunidade metanogênica: Filo
- Figura 62. Abundância relativa da comunidade metanogênica: Ordem
- Figura 63. Abundância relativa da comunidade metanogênica: gênero
- Figura 64. Reator antes e depois DA: gênero metanogênicas
- Figura 65. Diagrama de Cordas relacionado à comunidade metanogênica: gênero
- Figura 66. MEV do LE da ETE-Alegria
- Figura 67. Microscopia eletrônica de varredura
- Figura 68. Grânulo de lodo de esgoto
- Figura 69. Estágios e microrganismos envolvidos na DA do lodo de esgoto ETE-Alegria
- Figura 70. Análise de agrupamento hierárquico e matrix de correlação Archaea Bacteria
- Figura 71. Sintrofismo na DA do LE
- Figura 72. Proporções de mistura de coDA e rendimento do metano.
- Figura 73. Ensaios de qPCR com os genes 16S rRNA e mcrA

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Vantagens e limitações da digestão anaeróbia
- Tabela 2. Definições para sólidos encontrados no esgoto.
- Tabela 3. Valores diários de CH₄ produzido no experimento de validação do BMP.
- Tabela 4. Caracterização dos experimentos BMP.
- Tabela 5. Valores de pH ao início e ao final dos experimentos.
- Tabela 6. Valores para alcalinidade do lodo de esgoto da CEDAE.
- Tabela 7. Concentração de sólidos totais no lodo analisado.
- Tabela 8. Parâmetros físico-químicos do lodo de esgoto analisados durante dois anos de coletas
- Tabela 9. Medição do pH inicial e final e temperatura nos experimentos
- Tabela 10. Medição alcalinidade, DQO e TOC do lodo de esgoto ETE-Alegria
- Tabela 11. Comparativo da produção de metano em diferentes temperaturas.
- Tabela 12. Comparação da produção de CH₄ com diferentes tipos de armazenamento do lodo.
- Tabela 13. Parâmetros operacionais dos experimentos BMP para validação ADM1
- Tabela 14. Parâmetros físico-químicos do LE da ETE-Alegria.
- Tabela 15. Produção de metano
- Tabela 16. Biodegradabilidade das amostras ao final da DA em ensaios BMP (n = 6).
- Tabela 17. Entrada do modelo ADM1 do biodigestor.
- Table 18. ADM1 model AR output variables and BMP initial composition.
- Tabela 19. Comparação da produção de CH₄ entre o experimento BMP e o resultado do modelo computacional ADM1 (mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹)
- Tabela 20. Produção de metano em lodo de esgoto de ETE por outros autores
- Tabela 21. Otimização dos parâmetros de tempo de residência κ e χ para melhorar a produção de CH₄
- Tabela 22. Meta-análise de coDA entre 2012 e 2022
- Tabela 23. Estudos CoDA com lodo de esgoto ETE em BMP conduzidos por outros autores
- Tabela 24. Parâmetros físico-químicos coDA
- Tabela 25. Produção do rendimento do metano coDA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| BCM | Bilhões de metros cúbicos de metano |
| BMP | Potencial bioquímico do metano |
| CH ₄ | Metano |
| CoDA | Co-digestão anaeróbia |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DA | Digestão anaeróbia |
| DQO | Demanda química de oxigênio |
| ETE | Estação de tratamento de esgoto |
| GWh | Gigawatts hora |
| H ₂ | Hidrogênio |
| LE | Lodo de esgoto |
| MW | Megawatts |
| MO | Microrganismos |
| SA | Sardinha |
| SC | Simulação computacional |
| ST | Sólidos totais |
| SV | Sólidos voláteis |
| TWh | Terawatts hora (10 ¹² Wh ou 3,6×10 ¹⁵ joules) |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 19 |
| Objetivo geral | 22 |
| Objetivos específicos | 22 |
| Representação esquemática da tese..... | 24 |
| Produtos..... | 25 |
| 1 CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO | 26 |
| 1.1 Bioenergia | 26 |
| 1.2 Biogás, bioeconomia e capital natural | 29 |
| 1.3 Agenda 2030 para um mundo sustentável | 32 |
| 1.3.1 Políticas públicas brasileiras | 33 |
| 1.3.2 Políticas internacionais | 37 |
| 1.4 Mercado brasileiro de biogás e saneamento | 37 |
| 1.4.1 Mercado internacional de biogás..... | 43 |
| 1.5 Digestão anaeróbia | 45 |
| 1.6 Estação de tratamento de esgoto (ETEs) | 51 |
| 1.7 Potencial bioquímico do metano (BMP) | 55 |
| 1.8 Modelo computacional - Anaerobic Digestion Model n.1 | 59 |
| 1.9 Técnicas moleculares aplicadas ao estudo das comunidades microbianas no processo de digestão anaeróbia | 65 |
| 1.10 Organismos metanogênicos | 66 |
| 2 CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA | 72 |
| 2.1 Fluxograma de pesquisa | 72 |
| 2.2 Estação de tratamento de esgoto CEDAE - Alegria | 72 |
| 2.3 Coleta das amostras | 75 |
| 2.4 Análises físico-químicas para a caracterização do lodo | 77 |
| 2.5 Montagem dos experimentos BMP | 79 |
| 2.6 Modelo computacional ADM1 | 83 |
| 2.6.1 Módulo de simulação do sistema Reator Anaeróbio (RA) | 85 |
| 2.6.2 Módulo de simulação do sistema BMP | 86 |
| 2.6.3 Seleção e validação combinada de parâmetros do modelo RA e BMP | 86 |
| 2.7 Caracterização da comunidade microbiana | 89 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.7.1 | Extração de DNA..... | 89 |
| 2.7.2 | Preparo de biblioteca e análise de sequenciamento | 91 |
| 2.7.3 | Análise de dados | 92 |
| 2.7.4 | Sequenciamento 16S..... | 94 |
| 2.7.5 | Amplificação por PCR de genes associados às arqueias metanogênicas | 94 |
| 2.8 | Meta-análise da co-digestão do lodo de esgoto | 96 |
| 2.8.1 | Co-digestão de lodo de esgoto e sardinha | 96 |
| 2.9 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 97 |
| 3 | CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 99 |
| 3.1 | Parâmetros físico-químicos do lodo ETE-Alegria | 99 |
| 3.2 | Ambiente mesofílico e termofílico | 102 |
| 3.3 | Armazenamento do lodo | 104 |
| 3.4 | Caracterização do substrato | 105 |
| 3.5 | Avaliação do potencial de produção de metano do lodo da ETE-Alegria | 107 |
| 3.6 | Simulação computacional ADM1 combinada | 110 |
| 3.7 | Resultados da validação ADM1 em Julia baseado em EAD | 114 |
| 3.8 | Parâmetros operacionais e produção de biogás | 118 |
| 3.9 | Teor de carbono e biodegradabilidade do lodo | 120 |
| 3.10 | Utilização do modelo com ferramenta para prever resultados | 121 |
| 3.11 | Saída combinada do modelo AR-BMP e comparação com ensaio BMP | 121 |
| 3.12 | Otimização dos parâmetros operacionais | 122 |
| 3.13 | Análise molecular RNAr 16S do lodo: Archaea e Bacteria | 124 |
| 3.14 | MEV | 140 |
| 3.15 | SAOB - bactérias sintrófica oxidantes de acetato..... | 145 |
| 3.16 | Meta-análise da codigestão (coDA) do lodo de esgoto | 147 |
| 3.17 | Co-digestão de lodo de esgoto e sardinha | 149 |
| 3.18 | Análise qPCR da co-digestão anaeróbia do lodo | 153 |
| | CONCLUSÕES | 156 |
| | SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS | 158 |
| | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 159 |
| | REFERÊNCIAS | 160 |
| | ANEXO 1 - Analysis of biogas production from sewage sludge combining BMP experimental assays and the ADM1 model | 181 |
| | ANEXO 2 - Succession from acetoclastic to hydrogenotrophic microbial community | |

| | |
|---|------------|
| during sewage sludge anaerobic digestion for bioenergy production: 16SrRNA | |
| analysis | 213 |

INTRODUÇÃO

A fixação do homem, em qualquer região do planeta Terra, ocorre em função da disponibilidade energética necessária à sua subsistência. As fontes de energia existem sob diversas modalidades, as principais sendo: luz solar, ar, água e alimento. A eficiência ao consumir energia não é 100%, e em consequência resultam desta utilização diversos tipos de resíduos, tais como: esgoto, lixo e partículas na atmosfera (JORDÃO, 2017).

Diversas tecnologias vêm sendo aplicadas para promover o aproveitamento dos resíduos e minimizar os impactos ambientais causados pela disposição inadequada, como também para a redução na geração e o tratamento dos resíduos gerados (MAGALHÃES, 2018).

Com o desenvolvimento econômico, a quantidade de resíduos aumenta exponencialmente, havendo o agravamento dos problemas ambientais, econômicos, sociais e de saúde pública (ALMEIDA, 2023). Estima-se que 61% da população global vive sem acesso a instalações sanitárias, sendo que 892 milhões de pessoas defecam a céu aberto (ONU, 2018).

A deficiência no tratamento dos efluentes líquidos residenciais, mais conhecidos como esgoto doméstico, é um problema que atinge todas as áreas do país. De acordo com o Atlas de Esgotos da Agência Nacional de Águas e Saneamento (ANA, 2020), somente 55% da população brasileira possui acesso à coleta e ao tratamento adequado de esgotos, sendo produzido 9,1 toneladas de carga orgânica (esgoto) por dia no Brasil.

O biogás pode ser um grande aliado na universalização do esgotamento sanitário no país, pois permite reduzir os gastos energéticos do sistema, podendo inclusive gerar receita adicional para unidades de maior porte (ABIOGÁS, 2020).

Biometano é o gás constituído essencialmente de CH_4 , derivado da purificação do biogás, que, por sua vez, é o gás bruto obtido da decomposição biológica de produtos ou resíduos orgânicos. O biogás pode ter uma grande diversidade de composições, em função dos diferentes tipos de biomassa/resíduos disponíveis: resíduos agropecuários, esgoto e lodo de esgoto, resíduos sólidos urbanos, resíduos alimentares, resíduos industriais (PERECIN, 2017). Adicionalmente, a geração de biogás no tratamento de resíduos contribui para a redução da contaminação do solo e da água. A literatura técnica tende a considerar o biogás como uma energia renovável e biomassa moderna (COELHO et al., 2021).

O CH_4 obtido como resultado do tratamento de efluentes nas ETE's representa uma fonte renovável de energia. Se todo o esgoto disponível gerado por toda a população mundial fosse coletado e tratado por DA, haveria um potencial para gerar 210 a 300 TWh de energia, ou então, 22 a 32 bcm de biometano, o que poderia ser utilizado como fonte de calor e

eletricidade, permitindo atender às necessidades energéticas de 27 a 38 milhões de pessoas em todo o mundo (WBA REPORT, 2019).

A utilização do CH₄ desponta há muitas décadas como uma abordagem estratégica de conversão de biomassa residual em bioenergia - o biogás - e sua utilização para fins energéticos representa economia de recursos ambientais, bem como a redução dos poluentes do esgoto e consequente emissões de CH₄ lançado na biosfera (MAGALHÃES, 2018).

Considerada uma das pedras angulares da transição energética rumo à produção de energia sustentável no mundo (BOROWSKI et al., 2022; SZARKA et al., 2013), o biogás pode ser utilizado para a geração de calor e eletricidade, como combustível e, quando na forma de biometano pode ser armazenado e distribuído através de gás natural em grande escala, podendo também complementar fontes de energia renováveis flutuantes, como a energia eólica e solar (LUCAS, 2015).

O biogás é o produto final da degradação microbiana anaeróbia. Microrganismos (MO) associados aos domínios Bacteria e Archaea formam uma rede metabólica complexa para a degradação o material orgânico. Os MO que participam do processo de decomposição anaeróbia são distribuídos em três importantes grupos, com comportamentos fisiológicos distintos: (i) bactérias fermentativas que transformam por hidrólise os polímeros em monômeros, e estes, em acetato, hidrogênio (H₂), dióxido de carbono (CO₂), ácidos orgânicos de cadeia curta, aminoácidos e açúcares; (ii) bactérias acetogênicas, que convertem os produtos gerados pelas bactérias fermentativas em acetato, hidrogênio e CO₂ e (iii) arqueias metanogênicas, que utilizam os substratos produzidos pelas bactérias acetogênicas para a produção de metano e CO₂ (TREU et al., 2016).

A DA microbiológica e a estabilidade da formação do biogás, fundamentais para a operação de um reator, ainda não são bem compreendidas (LUCAS et al, 2015). O estudo da comunidade microbiana de um sistema de tratamento biológico é importante para que o conhecimento da microbiologia do processo possa levar ao aperfeiçoamento dos sistemas e ao aumento da eficiência na produção de biogás.

Em relação à composição microbiana e a função das comunidades metanogênicas em biorreatores, quatro questões principais são usualmente formuladas: (i) quais organismos estão presentes; (ii) como ocorre a mudança da comunidade ao longo do tempo; (iii) como vários microrganismos de diferentes grupos estão presentes; (iv) quais são as funções específicas dos microrganismos dentro da comunidade. Técnicas de ecologia molecular têm evoluído ao longo dos últimos anos para dar respostas a estas perguntas. Identificar os MO envolvidos no processo permite conhecer o potencial metabólico do sistema em questão (CABEZAS et al., 2015).

Avanços no desenho e conseqüente desempenho dos biorreatores têm sido possíveis por meio da compreensão da ecologia e da fisiologia dos diferentes grupos de MO responsáveis pelas reações de transformação de compostos nos sistemas de tratamento (GARCIA et al., 2020), como também através da modelagem matemática de processos e simulação computacional destinadas a prever o comportamento de um sistema, reduzindo significativamente a quantidade de experimentos necessários antes da descrição do mesmo (BATSTONE et al., 2018).

Vale ressaltar que o estudo e o desenvolvimento de tecnologias para a produção de biogás proveniente de biomassa no Brasil são possíveis devido à ciência, à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico, os quais não são possíveis sem o devido fomento por parte do Estado. A universalização do saneamento no país e a utilização de novas fontes de energia sustentável, em escala industrial, só se darão mediante apropriada atenção à pesquisa brasileira. Pesquisa realizada nas universidades e institutos de pesquisa públicos, tendo como mão-de-obra alunos de pós-graduação, que se mantém com bolsas oferecidas principalmente pela Capes e pelo CNPq. Embora economicamente defasadas, são estas bolsas e estas instituições de fomento que mantêm a ciência viva no Brasil.

A presente investigação, financiada pela FAPERJ, InovUERJ Qualitec, Capes e CNPq, teve como objetivo caracterizar através da biologia molecular a comunidade microbiana associada ao processo de conversão de lodo de esgoto de uma ETE em biogás, utilizando a simulação computacional e a montagem de aparatos experimentais em escala de bancada concomitante aos estudos da digestão anaeróbia.

O Capítulo 1 contém o referencial teórico, onde são abordados temas de relevância para o entendimento do presente estudo. No Capítulo 2 estão descritas as metodologias empregadas nos ensaios experimentais. O Capítulo 3 contém os resultados obtidos experimentalmente ao longo do período de doutoramento, bem como a discussão dos mesmos, frente a outros trabalhos publicados na literatura científica nacional e internacional. Em seguida, são apresentadas as conclusões, sugestões e perspectivas de trabalhos futuros para o prosseguimento da linha de pesquisa em foco, com base nas lições aprendidas e questionamentos surgidos durante a discussão dos resultados.

RELEVÂNCIA DO TRABALHO

A digestão anaeróbia (DA) é um processo complexo envolvendo diversos microrganismos onde resíduos orgânicos são convertidos em biogás, uma importante fonte de energia renovável. Sendo a anaerobiose cada vez mais compreendida como fonte de bioenergia, a confiabilidade e a estabilidade dos sistemas de digestão anaeróbia são fundamentais para garantir fontes de energia creditadas e operações industriais limpas. Atualmente o setor de biogás cresce mundialmente. Usinas de biogás são consideradas fábricas avançadas de bioenergia e são a base de um conceito de economia circular/bioeconomia direcionado à reciclagem de nutrientes, a descarbonização e biorrefinaria.

A integração de conceitos de ecologia microbiana molecular, engenharia ambiental, simulação computacional e bioinformática são de fundamental importância perante o cenário mundial atual em que novas tecnologias e conhecimentos são necessários para o desenvolvimento e o gerenciamento de espaços em que, ainda hoje, são precárias as condições relacionadas ao tratamento dos resíduos gerados e ao exacerbado uso de matrizes energéticas altamente poluidoras.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar a comunidade microbiana molecular (Bacteria e Archaea) associada à digestão anaeróbia do lodo de esgoto de uma ETE municipal de grande porte utilizando simulação computacional para a produção de biogás em reatores de bancada.

Objetivos específicos

1. Adaptar e padronizar experimentos de bancada para avaliar o potencial de produção de metano (BMP) do lodo de esgoto;
2. Caracterizar o lodo de esgoto de ETE para os ensaios BMP e para a simulação computacional;
3. Avaliar o potencial de produção de metano do lodo de esgoto em ensaios BMP em condições mesofílica e termofílica e utilizando monodigestão e co-digestão;
4. Utilizar o simulador computacional ADM1 para caracterizar a produção de biogás;

5. Calibrar e validar a produção de biogás obtida nos reatores BMP e no modelo computacional ADM1;
6. Caracterizar a comunidade microbiana total (Bacteria e Archaea) associada ao lodo de esgoto dos experimentos em ensaios BMP;
7. Avaliar a dinâmica de diferentes grupos de arqueias metanogênicas e bactérias durante os ensaios BMP.

HIPÓTESE INICIAL

As variações na comunidade microbiana durante o processamento do lodo de ETE, utilizado como inóculo e/ou substrato para a produção de biogás, estão diretamente associadas ao desempenho e rendimento do processo, uma vez que mudanças nas condições operacionais dos reatores podem modular a diversidade e a abundância microbiana, favorecendo a otimização da produção de biogás.

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TESE

Figura 1. Representação esquemática da tese



PRODUTOS GERADOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA TESE

i. Artigos publicados, submetidos e manuscritos em fase de elaboração

Esta tese é baseada no trabalho contido nos papers e manuscritos listados a seguir:

- I Rocha ME, Lazarino TC, Oliveira G, Teixeira L, Marques M, Mangiavacchi N. 2024. Analysis of biogas production from sewage sludge combining BMP experimental assays and the ADM1 model. **PeerJ** 12:e16720. <http://doi.org/10.7717/peerj.16720>
- II Rocha ME, Mangiavacchi N, Marques M, Teixeira L. Succession from acetoclastic to hydrogenotrophic microbial community during sewage sludge anaerobic digestion for bioenergy production: 16SrRNA analysis. **Biotechnology Letters**. <https://doi.org/10.1007/s10529-024-03528-6>
- III Biowaste to bioenergy production: anaerobic co-digestion of sewage sludge from a wastewater treatment plant with canned sardine and ADM1 model. Manuscrito.
- IV Are syntrophic acetate oxidating bacteria the real methanogenic regulators? Manuscrito.

A autora da tese também contribuiu nos artigos listados abaixo (que não fazem parte da tese), durante o período de doutoramento:

- IV Oliveira, Helena Rodrigues et al. Biogas potential of biowaste: A case study in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Renewable Energy**, v. 221, p. 119751, 2024.
- V Anacleto, Thuane Mendes et al. Anaerobic digestion as a tool to reduce anthropogenic impacts on aquatic ecosystems. **Oecologia Australis**, v. 26, n. 2, p. 169-186.

ii. Parceria institucional nacional

Celebração de acordo em parceria de pesquisa e coleta de amostras CEDAE – GESAR/UERJ.

iii. Parcerias Institucionais Internacionais

Rede Ipes - Rede Integrada de Produção de Energia e Sustentabilidade Brasil – Suécia.

Red Amaru - Rede Ibero-americana de Saneamento e Recursos Hídricos.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

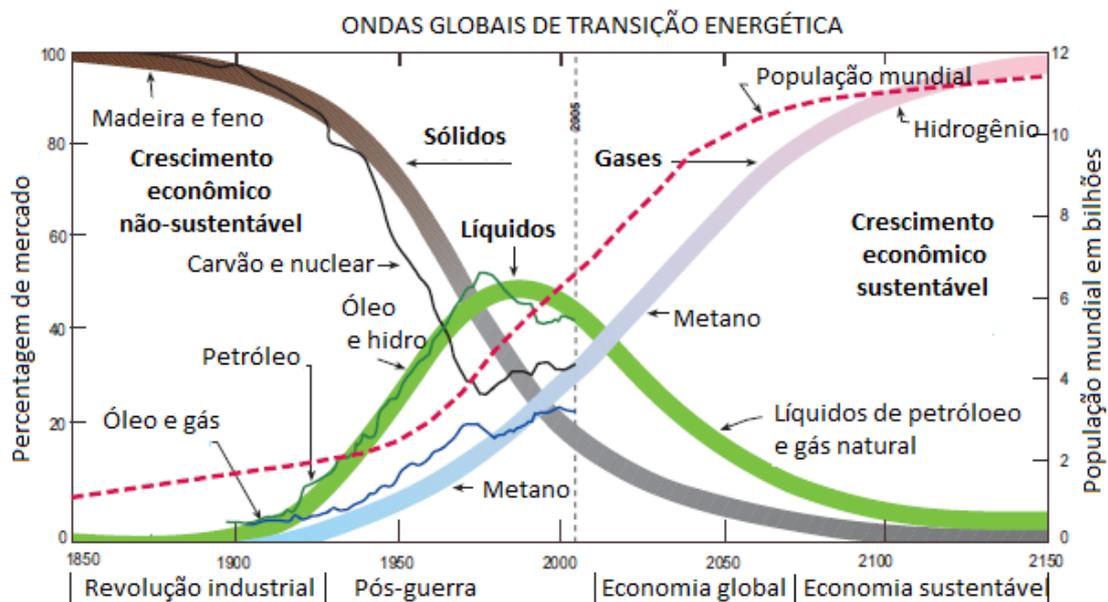
1.1 Bioenergia

O avanço promissor das energias renováveis contribui para a diversificação e a sustentabilidade das matrizes energéticas e economias globais (COELHO et al., 2021). A bioenergia possibilita o uso energético eficiente e sustentável, como também uma indústria emergente, que faz parte das trajetórias de mudança e de inovação do sistema de energia no mundo (UEN et al., 2023). Nesta transição em curso, o antigo sistema energético, que priorizava o uso de fontes não renováveis e a geração centralizada de energia, cede espaço para uma nova estrutura, caracterizada pelo uso de fontes renováveis e pela geração distribuída de energia (FGV, 2019).

Um número crescente de usinas de biogás em operação surgiu em todo o mundo nos últimos anos. A produção de biogás está concentrada na Europa e nos Estados Unidos (REN21, 2018). Na Europa, o número de plantas de biogás aumentou, com mais de 14.500 sistemas de biogás implementados (EBA, 2022). Os países líderes são Alemanha e Suécia, ultrapassando a marca de 12.000 digestores (IEA, 2022). Países como Brasil, Reino Unido, Suíça, África do Sul e Estados Unidos também construíram usinas de biogás (ANGELIDAKI et al, 2018).

Na modelagem (Figura 2) desenvolvida por Hefner (2007), foi avaliado como os padrões de combustíveis variaram e continuaram variando na matriz energética ao longo de 300 anos (1850 a 2150).

Figura 2. Transição energética global

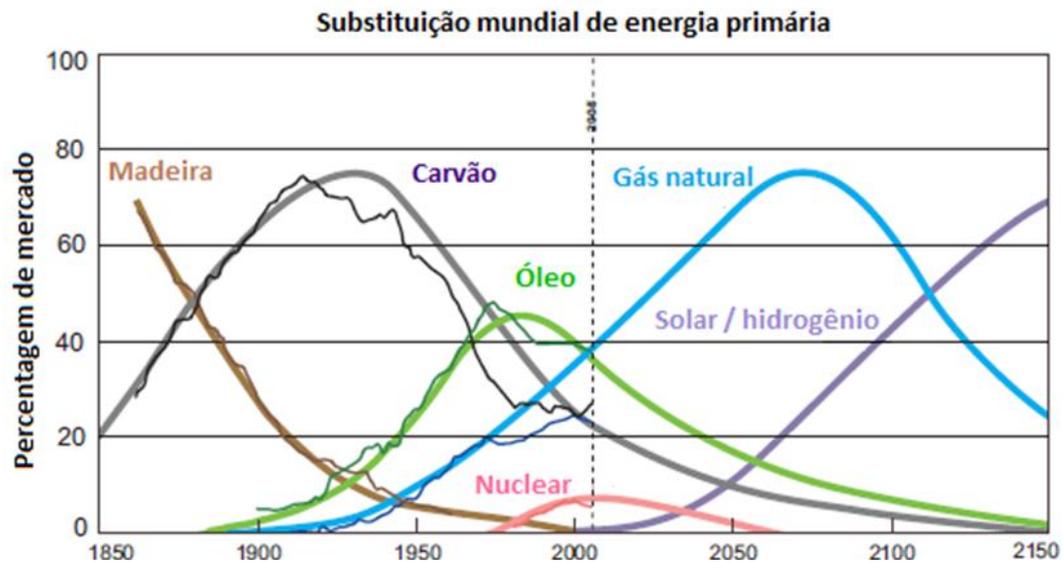


Fonte: Adaptado de HEFNER, 2007.

A ciência tem estudado os gases no intuito de propor uma nova matriz energética com o predomínio de fontes renováveis de energia. A matriz energética mundial vem evoluindo desde a predominância dos combustíveis sólidos (biomassa de madeira) a combustíveis líquidos (derivados de petróleo) até a era dos gases.

No estudo da utilização dos gases até atingir o seu ponto culminante, a intensa utilização do CH₄ (Figura 3) está prevista, de acordo com o modelo.

Figura 3. Substituição de energia primária mundial



Fonte: Adaptado de HEFNER, 2007.

A humanidade desenvolve, utiliza e substitui combustíveis diante de fatores determinantes como escassez, efeitos negativos imprevisíveis, impactos ambientais e desempenho econômico. O aproveitamento energético do biogás melhora o desempenho global do processo de tratamento de esgoto, uma vez que um subproduto do processo (biogás) é transformado na matéria-prima energia (MACHADO, 2021).

Com o aumento do conhecimento científico sobre este processo biológico, emergiram novos equipamentos e técnicas de operação (VOLSCHAN Jr, 2021). O resultado foi a generalização da ocorrência do processo dentro de um sistema fechado (reator) recorrendo a sistemas de aquecimento e mistura, tendo em vista a otimização das vantagens do tratamento anaeróbio (Figura 4).

Os sistemas de biogás diferem fortemente em localização, forma, estrutura de custos e padrões de uso. Essa diferença está relacionada principalmente às condições de desenvolvimento de cada país (BEP, 2022).

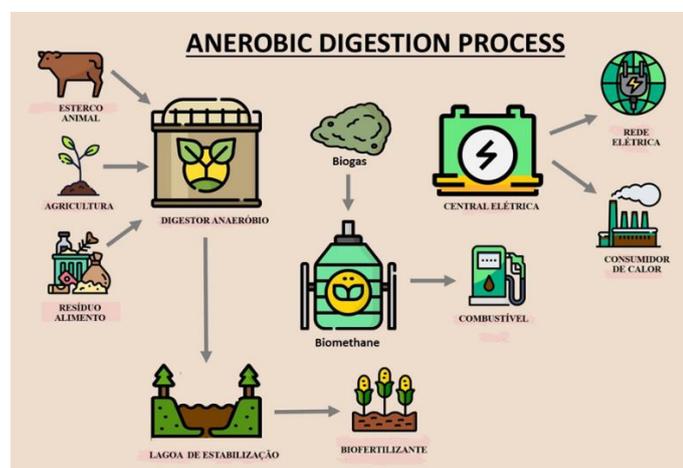
Figura 4. Modelo esquemático de produção do biogás.



Fonte: ABiogás, 2022.

Devido ao alto custo da energia e às preocupações com o aquecimento global, a utilização do biogás de diferentes fontes é crescente e recomendada pelos órgãos governamentais em todo o mundo. Quanto ao biogás oriundo de ETE, suas principais utilizações e destinações finais são: o lançamento sem tratamento (em que todo o CH₄ é liberado na atmosfera); a combustão direta sem a recuperação de energia; a combustão direta com geração e utilização do calor; a geração de energia elétrica; a cogeração de energia elétrica e calor; e a sua utilização em substituição ao gás natural (LOBATO, 2021; VENKATESH, 2023). A indústria da bioenergia – especificamente biogás – é uma indústria promissora quanto à capacidade de eficiência produtiva e ao maior equilíbrio socioambiental, estando na vanguarda da inovação, ao enquadrar-se dentro da biotecnologia, que configura uma das trajetórias inovadoras de maior desenvolvimento global (CONTARDI et al., 2018).

Figura 4. Produção de biogás através de diferentes biomassas



Fonte: KB Bioenergy, 2023.

1.2 Biogás, bioeconomia e capital natural

O desenvolvimento sustentável está se tornando um dos pilares dos novos negócios e a utilização do biogás, uma solução integrada de inovação, economia circular e conservação de capital natural em prol do desenvolvimento sustentável (FGV, 2019) expande o aproveitamento energético de biomassas oriundas do esgotamento sanitário e de resíduos sólidos urbanos alavancando o mercado doméstico e internacional, representando uma excelente oportunidade para a geração de novos negócios em países com grande potencial de produção de bioenergia, como é o caso do Brasil.

O uso global de recursos triplicou nas últimas quatro décadas, saltando de 26.7 bi de toneladas, em 1970, para 84.4 bi de toneladas, em 2015, de acordo com o relatório “The Circularity Gap Report”. O mesmo documento traz também projeções que apontam para um forte aumento na utilização destes recursos, estimado entre 170 bi e 184 bi de toneladas em 2050 (WBA, 2018). De acordo com a Rede Mundial de Políticas de Energia Renováveis (REN, 2016), no ano de 2015, mais de 80% da produção de energia global foi baseada em fontes não renováveis.

A exploração dos recursos alcançou resultados positivos em termos econômicos, mas gerou desequilíbrios sociais e ambientais. Segundo o Banco Mundial (BID, 2022), o Produto Interno Bruto (PIB) per capita mundial triplicou, entre 1990 e 2020, chegando a um valor de US\$ 16.940, ao passo que, entre 1990 e 2022, houve um aumento global de 40% das emissões de gases de efeito estufa (GEEs) e de 20% das emissões de gás carbônico (CO₂) per capita.

A digestão do esgoto gerado pela população mundial pode mitigar 75 a 100 Mt CO₂ eq. de GEE por ano deslocando a energia baseada em combustíveis fósseis e evitando as emissões da fabricação de fertilizantes minerais substituídos pelo digerido do lodo produzido (WBA, 2019).

As atividades econômicas propiciaram altos níveis de riqueza, mas desencadearam desequilíbrios socioambientais, que precisam ser enfrentados em prol de um desenvolvimento sustentável. Para a definição de estratégias e ações de desenvolvimento sustentável, faz-se necessário considerar o processo de extração, processamento, uso, descarte e reúso dos recursos, sendo fundamental considerar o capital natural e os serviços ecossistêmicos atrelados (DE WIT, 2018).

O capital natural pode ser entendido como uma metáfora econômica para os estoques limitados de recursos físicos e biológicos encontrados no planeta e, os serviços ecossistêmicos, como as contribuições diretas e indiretas dos ecossistemas para o bem-estar humano. Estes elementos representam o pano de fundo em que ocorre a exploração dos recursos naturais, que, uma vez processados e utilizados, são devolvidos ao próprio capital natural, gerando pressões e afetando sua biocapacidade para o oferecimento de serviços ecossistêmicos (SILVA, 2018).

A abordagem da economia circular (Figura 5) apresenta-se como um fator de dissociação entre o objetivo do desenvolvimento e o uso de recursos, na medida em que vai além da linearidade dos atuais sistemas econômicos, que preveem o processo de extração, produção e descarte, e almeja redefinir os processos de desenvolvimento, separando o uso de recursos finitos e o reúso dos resíduos e reduzindo as pressões sobre o capital natural (DE WIT, 2018).

Figura 5. O modelo de economia circular: menos matérias-primas, menos resíduos, menos emissões



Fonte: Serviços de estudos do Parlamento Europeu, 2023.

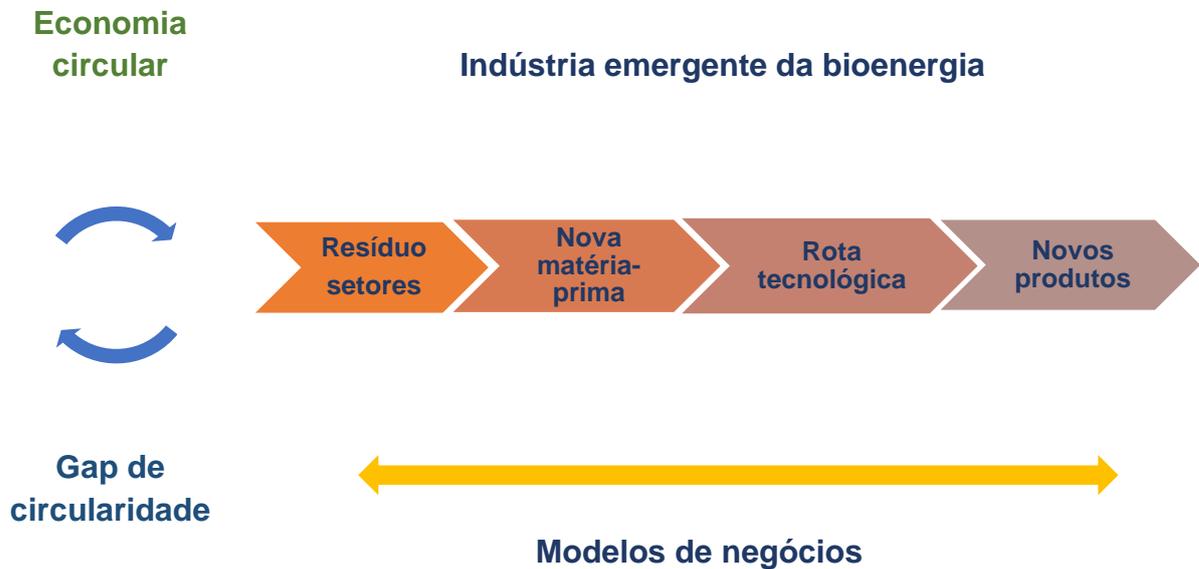
O incipiente desempenho dos atuais sistemas econômicos em relação à economia circular reflete, em 2018, a apenas 9,1% dos recursos novamente inseridos nos processos de produção e consumo de bens utilizados na economia global, o equivalente a 8,4 bi de toneladas.

Existe uma lacuna de 90% dos recursos que ainda poderiam ser reinseridos nas atividades econômicas. No ano de 2020, os recursos usados na economia global inseridos nos processos de produção e consumo de bens caiu para 8,6% e, em 2023 decaiu ainda mais: 7,2% (CIRCLE ECONOMY, 2023).

Se todo o esgoto do planeta fosse coletado e todo o lodo produzido fosse digerido, aproximadamente 0,23 bilhões de toneladas de lodo digerido contendo 2,6 Mt de nitrogênio, 1,3 Mt de fosfato, 0,12 Mt de potássio, 0,37 Mt de magnésio e 1,9 Mt de enxofre poderiam ser reutilizados. Isso é suficiente para fornecer fertilizantes para 30 milhões de hectares de terras aráveis substituindo cerca de 0,4 a 3% do fertilizante inorgânico global usado (FAO, 2020).

Este gap circular pode ser diminuído pelos avanços tecnológicos e pela difusão do desenvolvimento sustentável (Figura 6).

Figura 6. Lacuna de circularidade, capital natural e serviços ecossistêmicos e a indústria emergente da bioenergia.



Fonte: atualizado de FGV, 2019.

A diminuição do gap circular permite uma solução integrada para a conservação do capital natural e seus serviços ecossistêmicos, ou seja, o aproveitamento energético de biomassa gerada pelo esgotamento sanitário e resíduos sólidos urbanos (FGV, 2018). Este aproveitamento é uma forma de uso circular e sustentável desses insumos, que, ao não disporem de tratamento e disposição final adequados, geram pressões sobre o capital natural e fortalecem a linearidade da economia (SILVA, 2018).

A redução do gap circular referente ao esgotamento sanitário e aos resíduos sólidos requer o redesenho dos fluxos de recursos a partir da sua extração, processamento e uso, até seu reúso e descarte final. A exploração da relação água-energia, no que tange ao esgotamento sanitário, pode criar incentivos para aumentar a cobertura de coleta e tratamento de esgoto (EPE, 2021). O aproveitamento energético dos resíduos sólidos urbanos contribui para o fortalecimento da sua cadeia de valor, uma vez que, para a obtenção da biomassa apta para fins energéticos é preciso haver coleta seletiva eficiente, tratamento e disposição final adequados (ABES, 2021).

A bioeconomia disserta sobre recursos biológicos renováveis e biomassas que podem ser transformados em produtos de valor de forma sustentável – visa auxiliar na identificação de soluções para a transição energética planetária (BNDS, 2018). Insumos de biomassas oriundos de diversas fontes – vegetais lenhosos e não lenhosos, resíduos sólidos, esgotamento sanitário, entre outras – minimiza os impactos da economia linear, alavanca processos de circularidade e a conservação do capital natural (EIA, 2020).

A nova matéria-prima deverá ter uma cadeia produtiva associada que dê condições para que haja um fornecimento seguro, constante e sustentável, que garanta a alimentação dos processos tecnológicos de sua transformação em novos produtos (REN, 2020).

Nesse contexto, são relevantes os processos de inovação abertos, que integrem sistemas de incentivos nacionais e internacionais para a implantação de soluções tecnológicas eficientes, sendo pertinentes as trajetórias de absorção e transferência de tecnologia de outros países (BEN, 2020). A indústria emergente da bioenergia deve identificar modelos de negócio que considerem elementos regulatórios, institucionais, econômico-financeiros, mercadológicos e de sustentabilidade (DE WIT, 2018).

É valioso concentrar as atenções em uma variável crucial para os modelos de negócio: a tecnologia, sobretudo no que diz respeito às rotas tecnológicas disponíveis no mercado para a conversão energética de biomassa do esgotamento sanitário e dos resíduos sólidos (WBA, 2018).

A caracterização de rotas tecnológicas de conversão energética de biomassa enquadra-se dentro das soluções identificadas para a redução do gap de circularidade e da conservação do capital natural. As rotas tecnológicas apresentam-se sob uma perspectiva que engloba as dimensões fundamentais para a evolução da indústria emergente da bioenergia: matérias-primas, tecnologias de tratamento e conversão da biomassa, produtos e modelos de negócio.

Do ponto de vista da economia circular, a cadeia de valor do biogás oriundo de resíduos sólidos e esgotamento sanitário permite gerar valor para diversos setores econômicos – mobilidade, indústria, residencial, agronegócio – pois utiliza resíduos que, em outra hipótese, seriam descartados (FGV, 2019).

O biogás se insere nessa trajetória e pode contribuir para trazer melhorias econômicas e sustentáveis. Outro aspecto relevante a ser considerado é que o aproveitamento energético de resíduos sólidos e esgotamento sanitário não afeta outros setores, como o de produção de alimentos ou florestal (cultivo energético), que têm um grau maior de interdependência e competição com a questão da alimentação humana (FGV, 2020).

1.3 Agenda 2030 para um mundo sustentável

Os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável inseridos na Agenda 2030 das Nações Unidas são um apelo global à ação para acabar com a pobreza, proteger o meio ambiente e o clima e garantir que as pessoas, em todos os lugares, possam desfrutar de paz e de prosperidade. A Agenda 2030 possui 17 objetivos para o desenvolvimento sustentável (ODS) (Figura 7) e 169 metas.

O biogás proveniente de biomassas de esgotamento sanitário e resíduos sólidos coopera para que diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) sejam alcançados.

A erradicação da pobreza (ODS 1) pode ser incentivada através de mecanismos indutores associados a todos os outros ODS da Agenda 2030 da ONU.

A implantação de infraestruturas ligadas ao biogás pode estimular processos para o desenvolvimento de infraestruturas que ampliem o acesso à água e ao saneamento (ODS 6). A universalização do saneamento básico zela pela aproximação das questões sociais, econômicas e ambientais e ainda retrata a prestação dos serviços de saneamento básico como imprescindível à dignidade humana.

O aproveitamento energético (biogás) do esgotamento sanitário e resíduos sólidos contribui ainda para a diversificação de matrizes energéticas, fornecendo energia limpa e estável (ODS 7).

Para que a solução do biogás se torne mais factível, é importante que haja um sistema de infraestruturas sustentáveis e resilientes de saneamento e resíduos sólidos (ODS 9). Neste cenário, a inovação desenvolve um papel fundamental para a implantação de soluções eficazes.

O desenvolvimento urbano sustentável (ODS 11) é crucial para a identificação de soluções de equilíbrios entre essas dinâmicas divergentes, de modo que o biogás colabora para a redução dos impactos ambientais e sociais gerados pelas ineficiências dos setores de saneamento e resíduos sólidos.

Além disso, a solução energética do biogás representa valiosa contribuição para as questões climáticas, na medida em que reduz as emissões equivalentes de gás carbônico (ODS 13) e, conseqüentemente, impacta na diminuição do efeito estufa.

Figura 7. As 17 metas para o Desenvolvimento Urbano Sustentável da Agenda 2030 da ONU



Fonte: ONU, 2020.

1.3.1 Políticas públicas brasileiras

O Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos (SNIS) apresenta dados e informações relevantes sobre os índices de atendimento com os serviços de abastecimento de água e esgotamento sanitário no Brasil. O índice de atendimento total com rede de abastecimento de água, na média do país é de 83,7%. O índice de atendimento urbano de água equivale a 92,9%. 54,1% é o valor referente ao acesso à coleta de esgoto no país com 46,3% dos efluentes gerados tratados (SNSI, 2023). Quase 100 milhões de brasileiros não acessam o serviço de esgotamento sanitário e 35 milhões de brasileiros ainda não possuem água tratada.

O desenvolvimento de políticas públicas e iniciativas que visem desenvolver o setor de saneamento no Brasil de forma integrada e perene é muito importante, sendo essencial a atuação do setor público em conjunto com o setor privado, inclusive com políticas que fomentem o desenvolvimento do mercado, como por exemplo, através de projetos estruturantes de redes locais.

Os serviços públicos de saneamento estão intimamente vinculados à qualidade de vida, sendo a sua ausência ou deficiência, um fator grave que coloca em risco a saúde, a vida e a dignidade da pessoa humana.

São quase 100 milhões de pessoas sem coleta dos efluentes gerados lançados, sem qualquer tratamento, no mar e nos rios (BRASIL, 2020; MIRANDA et al., 2020). Para transpor essa realidade seria necessário um montante de recursos financeiros de R\$ 753 bi, considerando a recomposição dos ativos e novos investimentos; os prestadores precisariam investir R\$ 47 bi por ano, até 2033 (ABCON, 2020; ABAR, 2021).

A Lei de Diretrizes Nacionais para o Saneamento Básico (Lei Federal nº 11.445/2007) representa importante instrumento de avanço jurídico para o setor de saneamento básico, criando regras objetivas para temas recorrentemente apontados como deficiências setoriais: planejamento, regulação e controle social.

A regulação do saneamento, por meio de agências autônomas é recente no Brasil, em 2007, com a Lei de Diretrizes Nacionais para o Saneamento Básico - LDNSB, inaugurou-se uma etapa de maior controle sobre tarifas e preços públicos, além de um conjunto de regras de condutas de observação pelos operadores dos serviços públicos de saneamento básico, independentemente se públicos ou privados, especialmente dos serviços de abastecimento de água potável e do esgotamento sanitário.

Outro passo importante ocorreu em 2013, com o Plano Nacional de Saneamento Básico – instrumento de planejamento integrado relativo ao abastecimento de água potável, esgotamento sanitário, manejo de resíduos sólidos e drenagem das águas pluviais urbanas.

O programa Avançar Cidades – Saneamento, lançado em 2018, com o objetivo de melhorar o saneamento básico do país por meio de um processo de seleção pública de empreendimentos com vistas à contratação de operações de crédito para financiar ações de saneamento básico ao setor público.

Em resposta às trajetórias globais na área de meio ambiente, o país avançou em termos de política ambiental. Em 2009, houve a promulgação da lei nº 12.187, que instituiu a Política Nacional sobre Mudança do Clima. Posteriormente, em função da 21ª Conferência das Partes da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima, foi estabelecida a Contribuição Nacionalmente Determinada (em inglês, NDC) do Brasil, no que tange ao setor de energia.

A Lei n.º 14.026, de 15 de julho de 2020 alterou diversos dispositivos legais, nomeadamente a Lei n.º 11.445 de 5 de janeiro de 2007 – marco legal das diretrizes nacionais para o saneamento básico, com um enfoque na universalização dos serviços de saneamento básico e na prestação dos serviços de saneamento com qualidade e eficiência (ABAR, 2021).

A agenda de saneamento atual no Brasil tem como cerne principal o acesso ao serviço, sendo a sua universalização essencial para o desenvolvimento da sociedade. O planejamento efetivo e uma gestão eficiente, que estejam inseridos em um arcabouço regulatório favorável e tenham como paradigmas o foco em resultados e o aproveitamento de novas tecnologias,

criariam as condições para os avanços na infraestrutura de saneamento e na qualidade do serviço.

Com o advento da Lei de Diretrizes Nacionais do Saneamento Básico, as Leis da Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico - ANA, a Lei que regulamenta a participação da União em fundos para estruturação de projetos de concessão, a Lei dos Consórcios Públicos e a Lei da Política Nacional dos Resíduos Sólidos, foram alteradas com o propósito de estimular a regionalização da regulação e da prestação dos serviços públicos de saneamento básico, bem como a concorrência pelo acesso aos contratos de prestação de serviços públicos de abastecimento de água potável e esgotamento sanitário, por meio de processos licitatórios.

Com a alteração legislativa, o Governo Federal deseja promover a ampliação da participação da iniciativa privada no setor, na busca pela universalização do acesso aos serviços públicos de saneamento básico através de: (i) Programa de Parcerias e Investimentos (PPI) vinculado a Casa Civil da Presidência da República, que apoia a participação privada no processo de desenvolvimento urbano das cidades brasileiras; (ii) atuação da ANA, na uniformização do ambiente regulatório de serviços públicos predominantemente de interesse local e; (iii) com o BNDES responsável pela estruturação de projetos concessionários para os Estados, a exemplo do projeto de concessão dos serviços de abastecimento de água e esgotamento sanitário nas regiões metropolitanas de Maceió/AL, Porto Alegre/RS e Rio de Janeiro/RJ.

Ganha relevância a prestação regionalizada e a regra, caso a entidade não pertença a administração do titular (secretária municipal, autarquia comum, associação pública, empresa pública municipal e sociedade de economia mista) é a celebração de contrato de concessão para prestação dos serviços públicos saneamento básico e a regulação regional, por meio de consórcios públicos de regulação (formado por municípios titulares dos serviços públicos de saneamento básico) ou convênio de gestão associada, onde os municípios delegam a regulação e a fiscalização para agência reguladora do Estado, nos termos do art. 241 da Constituição Federal.

Em relação a prestação dos serviços, as alterações propõem o fim da contratação por dispensa de licitação com as companhias estaduais, impondo aos Estados novos desafios na articulação com os municípios.

Aproximadamente 1.700 municípios brasileiros ainda não contam com um ente regulador para fiscalizar e normatizar a prestação de serviços públicos de saneamento básico (água, esgoto, resíduos sólidos e drenagem urbana) (BEP, 2021).

Em relação aos serviços de água e esgoto, a revisão do Marco Legal prevê atendimento de 99% da população com abastecimento de água e 90% de esgoto coletado e tratado até 31 de dezembro de 2033, conforme art. 11-B da Lei federal nº 14.026/2020.

A instituição da Política Nacional de Biocombustíveis através da lei nº 13.576/2017 (RenovaBio), cujos objetivos são: (i) Contribuir para o atendimento aos compromissos do país no âmbito do Acordo de Paris sob a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima; (ii) Contribuir com a adequada relação de eficiência energética e de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa na produção, na comercialização e no uso de biocombustíveis, inclusive com mecanismos de avaliação de ciclo de vida; (iii) Promover a adequada expansão da produção e do uso de biocombustíveis na matriz energética nacional, com ênfase na regularidade do abastecimento de combustíveis e; (iv) Contribuir com

previsibilidade para a participação competitiva dos diversos biocombustíveis no mercado nacional de combustíveis.

Em 2015, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), por meio da Resolução nº 8, dispôs sobre o biometano oriundo de produtos e resíduos orgânicos agrossilvipastoris e comerciais destinado ao uso veicular (GNV) e às instalações residenciais e comerciais.

Em 2017, a Resolução nº 685 da ANP, estipulou regras para a aprovação do controle de qualidade e especificação do biometano oriundo de aterros sanitários e de estações de tratamento de esgoto destinado ao uso veicular e às instalações residenciais, industriais e comerciais a ser comercializado em todo o território nacional.

A Nova Lei do Gás (que substituiu a Lei nº 11.909/2009) discute como objeto principal a abertura do setor para o chamado Mercado Livre de Gás. Dentre as principais mudanças no regime regulatório do mercado de gás natural, destacam-se (i) a substituição do regime de concessão para o de autorização, quando da exploração de serviços de transporte e estocagem de gás natural; (ii) o acesso facilitado para terceiros às infraestruturas de gás natural; (iii) a previsão de mecanismos de desconcentração econômica, a serem utilizados pela ANP, quando do exame do setor, bem como de cooperação técnica entre o órgão regulador e o CADE; e (iv) proibição de integração vertical entre transportadoras e demais agentes atuantes na cadeia produtiva de gás.

Pela meta definida na NDC brasileira, o país deve atingir uma participação de 45% no uso de energias renováveis na composição da sua matriz energética em 2030, o que inclui, para o setor elétrico, a expansão do uso de fontes renováveis (além da energia hídrica) na matriz total de energia para um patamar de 28% a 33% até 2030 (EPE, 2018).

A NDC prevê ainda o aumento da participação de bioenergia sustentável na matriz energética brasileira para 18% até 2030. Estas metas estimulam os esforços de inovação de aproveitamento energético a partir de esgotamento sanitário e de resíduos sólidos, os quais contribuem para o combate às mudanças climáticas (BEP, 2021).

Essa discussão é oportuna, uma vez que o momento é de debate de marcos legais ligados tanto ao setor energético quanto ao setor de saneamento. Discussões relacionadas às reformas do setor elétrico e do novo mercado de gás, combinadas com a aprovação do novo marco legal do saneamento e com as questões sobre reformas tributárias, resultam em uma janela de oportunidades para a implementação de ações que melhorem o ambiente para projetos de aproveitamento energético de resíduos e que busquem, em paralelo, resolver questões estruturais (BEP, 2021).

O biogás tem um papel relevante na diversificação e sustentabilidade da matriz energética brasileira. Conforme as Resoluções nº 8 (2015) e nº 685 (2017) da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biometano pode ser utilizado, conjuntamente, na distribuição de gás natural, desde que atendidos os parâmetros técnicos.

Com a publicação da Lei nº 14.134, de 08 de abril de 2021, denominada Nova Lei do Gás, o Estado brasileiro busca dinamizar o setor de gás no Brasil com o objetivo de incremento da concorrência no setor a partir da oferta da molécula por novos supridores e, por conseguinte uma redução do valor da molécula de gás comercializado no Brasil.

1.3.2 Políticas internacionais

Políticas específicas que fornecem incentivos financeiros têm sido eficazes para estimular o aumento da capacidade da DA no Reino Unido e na Alemanha. A segurança de longo prazo sobre os incentivos ajuda a criar um ambiente de baixo risco para o crescimento do setor de DA.

Segundo a World Biogas Association, a Alemanha, em sua Lei de Cotas de Biocombustíveis, estabeleceu uma participação mínima de biocombustíveis a serem vendidos no mercado de energia. O Chile estabeleceu um requisito mínimo para a proporção de energia proveniente de fontes renováveis, que foi aumentada para 20% até 2025.

Feed in Tariffs foi introduzido na Malásia para o tratamento de resíduos de óleo de palma. O plano nacional de energia da África do Sul prevê incentivos para a produção de energia renovável.

Na Finlândia, o biometano está isento de imposto para produção e consumo. Na República Dominicana, equipamentos e acessórios relacionados à instalação de biodigestores estão isentos de impostos sob a Lei de Desenvolvimento de Energias Renováveis. No Reino Unido, a Taxa de Mudança Climática tributa as empresas pelo uso de energia, mas elas estão isentas para energia proveniente de fontes renováveis. Os créditos para combustível renovável de transporte são aplicados na Bélgica, no Reino Unido, nos Estados Unidos, Itália, Suécia e Noruega.

A Agência Internacional de Energia (AIE) possui um programa de pesquisa e desenvolvimento em bioenergia, no qual pretende acelerar o uso de bioenergia ambientalmente sustentável e competitiva em termos de custos que contribuirá para futuras demandas de energia de baixo carbono.

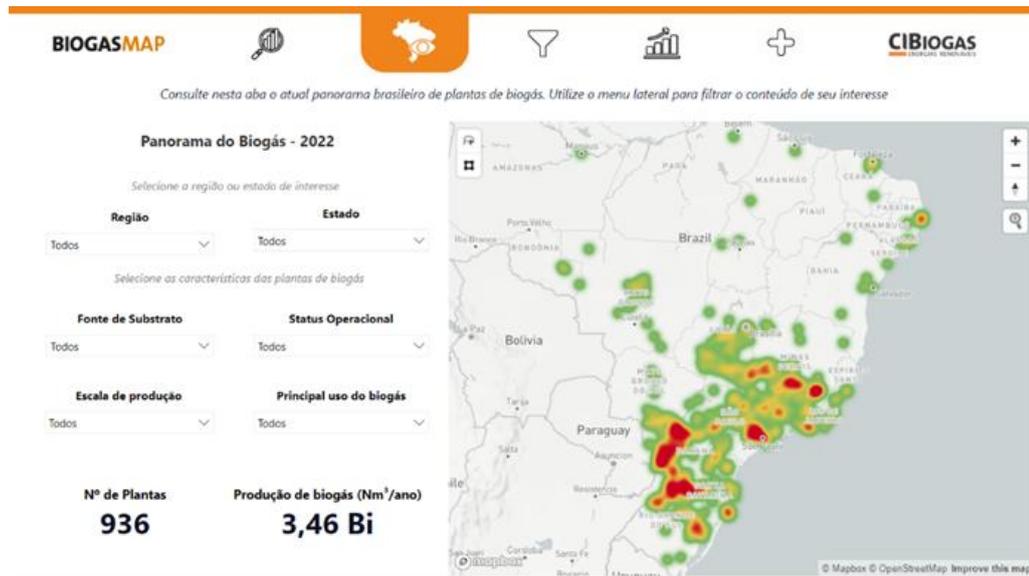
A AIE atua como consultora de política energética para 29 países membros, além da Comissão Europeia, em seu esforço para garantir energia confiável, acessível e limpa para seus cidadãos. São países membros: Áustria, Austrália, Brasil, Canadá, Dinamarca, Estônia, Finlândia, França, Alemanha, Irlanda, Coreia, Suécia, Suíça, Holanda, Reino Unido.

1.4 Mercado brasileiro de biogás e saneamento

O mapa do Biogás (Figuras 8 e 9) mostra existir aproximadamente 900 plantas de biogás no país das quais 57 utilizam como fonte de biomassa RSU e esgoto (Figura 10). A maioria das plantas de biogás utilizando resíduos de saneamento estão localizadas no estado de São Paulo e do Paraná (14 e 10, respectivamente) (Figura 11).

O Brasil apresenta elevado potencial para o aproveitamento energético de resíduos, conforme demonstram estudos publicados por instituições ligadas ao planejamento energético. Segundo estimativas do Programa de Energia para o Brasil (BEP), o potencial de biogás no país a curto prazo é de 10,9 bilhões Nm³/ano, equivalendo a 4.7% do consumo nacional de energia elétrica ou a 12.4% do consumo total nacional de diesel em 2019 (BEN, 2020). Montante considerável que pode ser obtido através dos resíduos sólidos urbanos e esgoto (EPE, 2021).

Figura 8. Mapa das plantas de biogás no Brasil (agropecuária, indústria, RSU, esgoto).



Fonte: BiogasMap, CIBiogás 2023.

Figura 9. Evolução do setor de biogás no Brasil (agropecuária, indústria, RSU, esgoto).



Fonte: BiogasMap, CIBiogás 2023.

Estudo da Associação Brasileira de Biogás (ABIOGÁS, 2020) mostra que o potencial total de geração de biogás, com premissas baseadas no ano de 2019, seria de 43 bilhões de m³, concentrado principalmente no setor sucroalcooleiro (49%); a agroindústria responde por 47% do potencial e o saneamento por 4%. Em termos de geração elétrica, esse potencial total representaria cerca de 170 GWh/ano.

Dados da Agência Nacional de Energia Elétrica (Aneel) apontam que a energia elétrica gerada a partir da biomassa contribui na matriz energética brasileira com uma parcela de 9%, sendo a terceira fonte de energia, atrás de fósseis (15%) e hidrelétricas (61%).

O interesse pela produção de biogás tem crescido exponencialmente no Brasil. O número de usinas produtoras de biogás aumentou de 100, em 2009, para 550, em 2020; alcançando a potência instalada de 42,8 MW em 2020, capacidade suficiente para suprir 34,5% da demanda por energia elétrica ou 70% da demanda de diesel no país, de forma sustentável e renovável (ABILOGÁS, 2021).

Apesar do grande potencial, o desenvolvimento do mercado é de médio a longo prazo, pois a expansão está fortemente condicionada pela eficiência de políticas públicas e ao controle da gestão adequada de resíduos urbanos e rurais (EPE, 2020). Diversas iniciativas estão sendo desenvolvidas pelo setor privado e pelos governos (municipal, estadual ou federal) no intento de diversificar a matriz energética, incluindo os incentivos para a expansão do uso de biometano.

Como exemplos, a Arsesp (Agência Reguladora de Serviços Públicos do Estado de São Paulo) emitiu a Deliberação ARSESP nº 744, de 26 de julho de 2017, que dispõe sobre as condições de distribuição de biometano na rede de gás canalizado no âmbito do Estado de São Paulo; o Governo do Rio Grande do Sul, instituiu a Política Estadual do Biogás e do Biometano (Lei Estadual nº 14.864, de 11 de maio de 2016) e o Governo Federal instituiu a Política Nacional de Biocombustíveis – RenovaBio (Lei nº 13.576, de 26 de dezembro de 2017).

Figura 10. Mapa das plantas de biogás no Brasil (RSU, esgoto).



Fonte: BiogasMap, CIBiogás 2023.

Figura 11. Evolução do setor de biogás no Brasil (RSU e esgoto).



Fonte: BiogasMap, CIBiogás 2023.

Usualmente, o preço do biometano é considerado o mais importante limitador para o desenvolvimento deste mercado. Contudo, cabe observar que as estimativas mais recentes mostram uma proximidade do preço praticado pela Petrobrás para fornecimento de gás natural, superior a R\$ 1,00/m³ (EPE, 2020), e os preços de biometano – estudo da EPE (2018) mostra que os preços de biometano derivado do biogás de resíduos urbanos, estariam em equilíbrio entre R\$ 1,04/m³ até R\$ 1,19/m³, para produção em grande escala (para produção em média escala, chegaria a R\$ 1,8/m³).

O gás derivado dos resíduos de tratamento de lixo e esgoto, possui potencial de fornecimento para grandes centros, mas ainda possui geração muito limitada – o que se espera, é que este cenário mude drasticamente ao longo dos próximos anos por conta das regras trazidas pelo marco setorial do saneamento e as obrigações para tratamento de resíduos sólidos urbanos.

O projeto Cidades Sustentáveis aprovado pela Arsesp, uma rede local na cidade de Presidente Prudente abastecida com biometano produzido pela Cocal Energia Ltda. Na nota técnica que aprovou os resultados da 4ª revisão tarifária ordinária da concessionária Gás Brasileiro Distribuidora (GBD), a Arsesp indicou que o projeto estaria em consonância com os objetivos traçados pelo Governo do Estado de São Paulo e sua política energética. O projeto estimado em R\$ 30,5 milhões (aproximadamente 14% dos investimentos totais aprovados para o ciclo tarifário quinquenal) e incluído nas tarifas dos usuários da GBD. Posteriormente, a Agência publicou a Deliberação ARSESP nº 1.093/2020, que aprovou o contrato de compra e venda de biometano entre a GBD e a Cocal Energia.

As usinas de biogás estão geograficamente localizadas principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país. Com o advento, em 2007, da Resolução nº 685, da ANP, foi possível comercializar, em todo o território nacional, biometano proveniente de aterros sanitários e estações de tratamento de esgoto para uso veicular e instalações residenciais, industriais e comerciais (EPE, 2018).

A injeção de biometano na rede de distribuição: CTR Santa Rosa, no município de Seropédica/RJ, e GNR Fortaleza, no município de Caucaia/CE; comercialização do biometano

para uso veicular pela venda em postos: caso da GNR Dois Arcos, no município de São Pedro d'Aldeia/RJ. Apesar disso, os movimentos de mercado continuam tímidos quando comparados ao potencial nacional de produção de biometano.

Explorar a relação água-energia tendo como base o aproveitamento energético a partir do tratamento de esgoto, pode criar incentivos para aumentar os níveis de cobertura de coleta do esgoto no Brasil e alavancar processos de inovação tecnológica (FGV, 2020).

Segundo a EPE (2020), para a geração de biogás a partir de resíduos sólidos e esgotamento sanitário no Brasil, um equivalente a 38% dos empreendimentos utilizam biodigestores anaeróbios a partir de aterro sanitário, 16% advindos de estações de tratamento de esgoto e 3% utilizam a incineração.

A partir do arcabouço de políticas públicas existentes e do balanço da produção nacional de biogás, é possível apontar o nível de maturidade do mercado de biogás brasileiro. Dentro de uma lógica de cadeia de valor e de difusão de inovações, os insumos de resíduos sólidos e esgotamento sanitários estão em estágio “incipiente” e “moderado”, pois, embora haja a regulação, há graus de ineficácia do mercado, de caráter social e econômico, que fazem com que os avanços no setor sejam demorados (FGV, 2020).

Para a identificação de modelos de negócio viáveis sob uma perspectiva econômico-financeira e tecnológica para que se alcance um nível satisfatório de crescimento desse mercado, é imprescindível a aplicação de recursos em pesquisa e desenvolvimento (P&D), na capacitação de mão de obra e em investimentos do setor empresarial.

De acordo com a SNSA (Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental), em 2016, o capital expenditure (Capex) e o operational expenditure (Opex) do mercado do biogás estão em um patamar elevado. Segundo o relatório da secretaria, as principais razões para que o setor tenha custos elevados são os investimentos necessários para a aquisição de conhecimento, a elaboração de projetos e a compra de equipamentos. Também devem ser considerados, na reflexão sobre modelo de negócios, os desafios a serem superados na geração de receitas a partir da venda de subprodutos do biogás, entre eles, a eletricidade, o Gás Natural Veicular (GNV) e a energia térmica. Dessa forma, a viabilidade econômico-financeira do investimento em biogás precisa identificar seu ponto de equilíbrio e enfrentar os desafios existentes (FGV, 2020).

O crescimento constante do biogás no Brasil é resultado de uma série de políticas, pesquisas e iniciativas ligadas direta ou indiretamente a esse setor. São descritos a seguir fundamentos políticos e fontes de financiamento relacionados ao biogás no Brasil:

- . A Política Nacional de Resíduos Sólidos aponta para a gestão integrada e ambientalmente adequada dos resíduos sólidos e garante a adoção de iniciativas relacionadas à biomassa na produção de energia;

- . O Plano Setorial de Mitigação e Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura - política pública que descreve detalhadamente os procedimentos de mitigação e atividades afins em relação às mudanças climáticas no setor agropecuário;

- . Resolução Normativa n. 687/2015 que altera a Resolução Normativa n. 482/2012 da Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL e estabelece os critérios gerais para o acesso da micro e minigeração distribuída aos sistemas de distribuição de energia elétrica e ao sistema de compensação de energia elétrica;

. Resolução 08/2015 da Agência Nacional do Petróleo - ANP, que regulamenta o biometano proveniente de produtos e resíduos agrossilvopastoris orgânicos direcionados para aplicação veicular (GNV) e para instalações residenciais e comerciais;

. Programa ABC - Programa Agricultura de Baixo Carbono: Disponibiliza linhas de crédito para iniciativas no âmbito do Plano Agricultura de Baixo Carbono, com recursos para o tratamento de dejetos animais;

. PRONAF Sustentável: Linha de crédito para aspectos de sustentabilidade ambiental para a agricultura familiar com aplicação de recursos de crédito do Programa Nacional de Agricultura Familiar - PRONAF (Programa Nacional para Agricultura Familiar);

. Leilão A-5 ANEEL de energia elétrica: Pela primeira vez um projeto de biogás de grande porte ganhou um leilão de geração de energia, o Leilão A-5, promovido pela ANEEL. O projeto vencedor chama-se Raízen e comercializa 20,8 MW de energia com a empresa Biogás Bonfim, representando R\$ 251 por MWh. O substrato utilizado para a produção do biogás - efluente da indústria sucroenergética;

. RenovaBio 2017 chamada pública para o programa de incentivo à expansão dos biocombustíveis no Brasil. Foi sancionado pela Lei 13.576/2017, que cria a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio). O biometano é um dos combustíveis a serem fomentados por este programa;

. Resolução ANP nº 685/2017 que estabelece normas para aprovar a qualidade e especificações do biometano de aterros sanitários, estações de tratamento de esgoto para uso móvel, bem como para uso residencial, industrial e comercial.

Ações da iniciativa privada, sociedade civil e organizações de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação:

. Associação Brasileira do Biogás e Biometano (Abiogás). É formada por empresas e instituições públicas e privadas que atuam em diversos segmentos da cadeia do biogás.

. Programa Nacional de Biogás e Biometano (PNBB). O Plano visa a criação de um cenário institucional econômico, normativo e regulatório que promova as condições favoráveis e estáveis necessárias para o avanço de projetos importantes para a sustentabilidade da matriz energética brasileira;

. Chamada Pública 014/2012 - P&D da ANEEL. Chamada de projetos de pesquisa e desenvolvimento sobre o tema biogás: "Projeto Estratégico: Arranjos Técnicos e Comerciais para a Inserção da Geração de Energia Elétrica com o aproveitamento do Biogás originado de Resíduos e Efluentes Líquidos no Brasil Matriz Energética";

. CIBiogás-ER. Instituição de pesquisa, desenvolvimento e inovação com o objetivo de transformar o conhecimento do biogás em produto por meio do desenvolvimento de novos empreendimentos e sua efetiva implantação na matriz energética brasileira;

. Projeto Brasil-Alemanha para a Promoção da Aplicação da Energia do Biogás no Brasil (PROBIOGAS). O Ministério das Cidades do Brasil implementou iniciativas com o Governo Alemão, por meio da GIZ (Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit), para a aplicação da energia do biogás no Brasil.

. REDE IPES (Rede Integrada de Produção de Energia e Sustentabilidade). Desde 2019, a equipe executora tem como atribuições propor, planejar e acompanhar programas, projetos e ações pactuadas nas áreas de energia e sustentabilidade, sendo composta por pesquisadores de

7 instituições de ensino e pesquisa: Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto Militar de Engenharia (IME), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Universidade Federal Fluminense (UFF), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e Universidade de Linköping (Suécia). Possui projeto Faperj aprovado Edital E_12_2021: Produção de bioenergia a partir do tratamento de resíduos do saneamento: transformando passivos ambientais em recursos e oportunidades;

. REDE AMARU (Rede Ibero-americana de Saneamento e Recursos Hídricos). Objetiva promover a cooperação científica em pesquisa, desenvolvimento e inovação, sinergia entre os países membros, análise das dimensões econômicas dos serviços para acesso à água segura e de qualidade, saneamento e higiene, intercâmbio de conhecimento e transferência de tecnologia, considerando as capacidades de P&D&I, para sua adaptação na Região Ibero-americana, considerando critérios de qualidade ambiental, na detecção de contaminantes emergentes, inorgânicos e microbiológicos de interesse. Desde a sua criação em 2021, todos os seus membros têm realizado reuniões para estabelecer estratégias de ação e desenvolver estudos e projetos.

O aumento dos fluxos de conhecimento e inovação entre as nações estimula a difusão do potencial de crescimento dos sistemas econômicos. As economias emergentes são beneficiadas pelos efeitos positivos, tais como o crescimento econômico e os ganhos em produtividade.

1.4.1 Mercado internacional de biogás

A produção anual de biogás (Figura 12) é de cerca de 120 TWh na Alemanha, 25 TWh no Reino Unido², 9 TWh na França, 5 TWh no Brasil e cerca de 4 TWh na Dinamarca e Holanda. Os restantes países apresentam taxas de produção inferiores a 3 TWh (AIE, 2023).

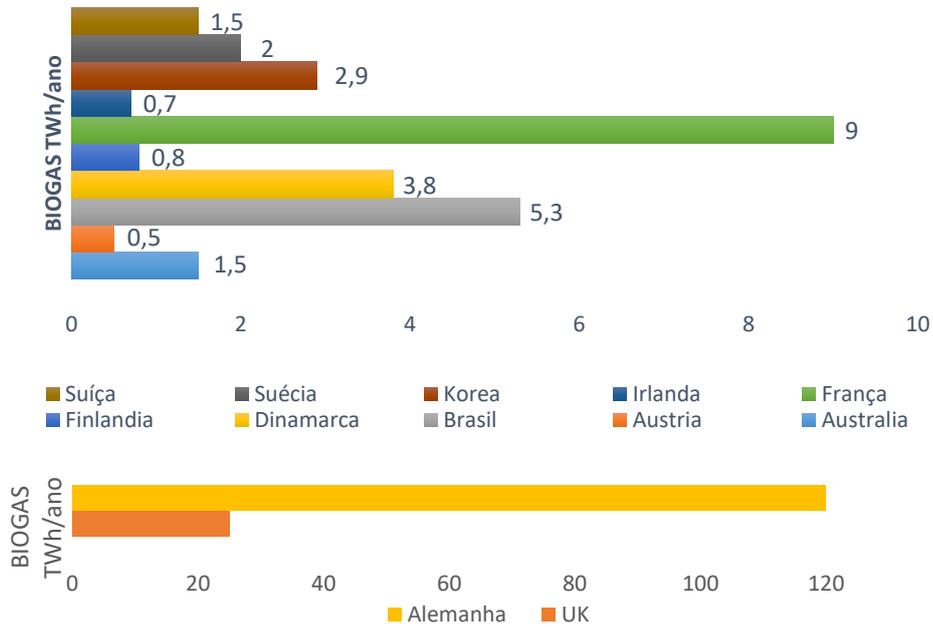
Em países como Austrália e Reino Unido, o biogás produzido em aterros é a maior fonte, enquanto o gás de aterro é apenas uma contribuição menor em países como Alemanha, Suíça e Dinamarca, indicando o baixo nível de aterro de resíduos orgânicos (AIE, 2023).

O biogás produzido na maioria dos países é usado principalmente para geração de calor e eletricidade, exceto na Suécia, onde mais da metade do biogás produzido é usado como combustível veicular.

A Alemanha é a segunda em números absolutos em termos de biogás como combustível para transporte. Muitos outros países, como França, Holanda, Dinamarca e Coreia do Sul, têm mercados emergentes para o biometano como combustível para transportes rodoviários (AIE, 2023).

A Alemanha e a Suécia apresentam os maiores mercados para o biometano nos últimos anos, mas também se observa um interesse crescente em outros países. O Reino Unido agora assumiu a segunda posição da Suécia, usando cada vez mais biometano para produção de calor e eletricidade. França e Suíça são exemplos de outros países com crescimento significativo (AIE, 2023).

Figura 12. Produção de biogás por ano nos países membros AIE

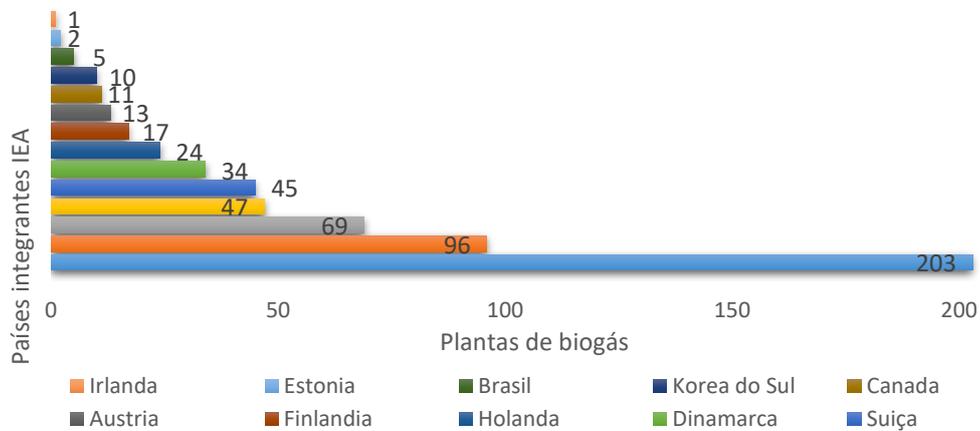


Fonte: Adaptado do Relatório 2023 Agência Internacional de Energia (AIE).

A quantidade de biometano produzido e o número de usinas de atualização de biogás estão aumentando. A distribuição das 577 usinas de aproveitamento de biogás (Figura 13) entre os 37 países membros da Tarefa de Bioenergia da AIE.

Os sistemas de apoio financeiro variam para cada país. Existem vários sistemas com tarifas feed-in, subsídios ao investimento e isenções fiscais. Uma clara correlação entre o sistema de apoio financeiro e a forma como o biogás é utilizado é evidente nos países membros da Tarefa 37.

Figura 13. Distribuição das usinas de biogás reportadas para IEA



Fonte: Adaptado do Relatório 2023 Agência Internacional de Energia (AIE).

Em países como o Reino Unido, Alemanha e Áustria, as tarifas feed-in de eletricidade levaram a maior parte do biogás a ser usado para produzir eletricidade, enquanto o sistema com isenção de impostos na Suécia favorece a utilização do biogás (biometano) como combustível veicular. Em vários países, incluindo França, Dinamarca, Suécia e Reino Unido, os sistemas de apoio financeiro levaram a um aumento da participação do biogás nas redes de gás (AIE, 2023).

1.5 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia (DA) é um processo que ocorre naturalmente em ambientes com elevada escassez ou ausência de oxigênio. Os fatos históricos indicam que este processo é uma das mais antigas tecnologias de que se tem conhecimento.

Alguns registros da utilização do biogás para aquecimento de água na região da Assíria remontam 1000 anos a.C (KASINATH et al, 2021). No século XVII, van Helmont postulou a emanção de gases inflamáveis a partir da decomposição de matéria orgânica. Um século depois, Alessandro Volta anunciou uma correlação direta entre a quantidade de matéria orgânica decomposta e a quantidade de gases produzida. Em 1808, Sir Humphry Davy demonstrou a presença de metano nos gases emergentes da digestão anaeróbia (NAGHAVI et al, 2022). Em 1884, Ulysse Gayon, aluno de Louis Pasteur, realizou a fermentação anaeróbia de uma mistura de esterco e água, a 35°C, conseguindo obter 100 litros de metano por metro cúbico de mistura. Pasteur, ao apresentar à Academia das Ciências da França os trabalhos do seu aluno, considerou que esta fermentação poderia constituir-se numa fonte de aquecimento e iluminação (MAHLA et la., 2022).

Na Índia, no ano de 1859, foi realizada em uma colônia de hansenianos na cidade de Bombaim (atual Mumbai) a primeira experiência de utilização direta de biogás. Em 1895, foi posta em prática a primeira experiência européia, o biogás produzido em uma estação de tratamento de esgoto em Exeter, Inglaterra, foi recolhido e utilizado como combustível na iluminação pública (SADEGHIAN et al., 2021).

Nos anos 30, Buswell e colaboradores conduziram trabalhos de investigação que identificaram e documentaram as bactérias anaeróbias e as condições ambientais que promovem este processo biológico. Em 1940, devido a carências energéticas significativas provocadas pela II Guerra Mundial, o biogás difundiu-se para ser utilizado nas cozinhas, para o aquecimento de casas e para a alimentação de motores de combustão interna (MACHADO, 2021). Segundo o mesmo autor, nas décadas de 1950 e 1960, a relativa abundância das fontes de energia tradicionais desencorajou a recuperação do biogás na maioria dos países desenvolvidos e, apenas em países com poucos recursos de capital e energia, como a Índia e a China, o biogás desempenhou um papel de certa importância, sobretudo em pequenas comunidades rurais.

A partir da crise energética dos anos 1970, o gás metano dos digestores anaeróbios passou a ser estudado mais intensamente pela comunidade científica. A alta acentuada no preço dos combustíveis convencionais encorajou as investigações na produção de energia a partir de novas fontes alternativas e economicamente atrativas, de modo a criar novas formas de produção energética que possibilitem a redução do uso dos recursos naturais esgotáveis. Atualmente as questões ambientais aquecem o tema.

No Brasil, o aproveitamento do biogás como combustível para veículos automotores sofreu um impulso na segunda metade dos anos de 1970 devido ao aumento do preço de venda dos combustíveis líquidos (JORDÃO, 2017). Atualmente, como consequência da pesquisa espacial, a observação de metano na atmosfera pode ser considerada como provável indício da presença de vida num dado planeta, em função da relevância da via biótica de produção desse gás (SANT'ANNA JUNIOR, 2010).

A digestão anaeróbia gera o biogás - composto por metano 50 - 75%, gás carbônico 25% a 50%, outros gases e vapor - o qual pode ser aproveitado energeticamente de diversas formas, como biocombustíveis, eletricidade, aquecimento, condicionamento, substituto do gás natural, vapor e bioprodutos, podendo atender a uma ampla gama de indústrias - transporte, setor elétrico, gás canalizado, processos industriais e biofertilizantes.

Os processos de DA possuem baixa síntese de biomassa e produção de energia sob a forma de CH_4 pela conversão de substratos orgânicos. Do ponto de vista da engenharia do ambiente, a degradação anaeróbia (diversas interações metabólicas entre diversas espécies de MO) possibilita o tratamento de efluentes, a redução de matéria orgânica, a produção de CH_4 e a sanitização de resíduos (JORDÃO, 2017).

Diferentemente dos ambientes aeróbios, onde os altos rendimentos energéticos do metabolismo conduzem para reações preferencialmente utilizando oxigênio como aceptor final de elétrons, habitats anóxicos contam com o metabolismo interativo para degradar completamente os compostos orgânicos complexos e tornar sua energia armazenada biodisponível (NAKAYAMA et al., 2019).

O sucesso da digestão nos biorreatores aneróbios - grande produção de metano e degradação da matéria orgânica - está ligado a fatores ambientais e operacionais tais como: temperatura, pH, nível de amônia, taxa de carregamento, alimentação do biorreator, tipo e quantidade de inóculo (fonte adicional de microrganismos) utilizado para potencializar a digestão, modo operacional e tempo de retenção (LUCAS, 2015).

As vantagens do tratamento anaeróbio (Tabela 1) em relação a outros processos fazem com que haja um crescente interesse neste processo biológico através do desenvolvimento de inúmeros trabalhos de investigação nos domínios das ciências biológica, química, ambiental e da engenharia, com vistas ao melhoramento da tecnologia anaeróbia. Através da produção de CH_4 convertido em energia, é possível minimizar os custos de operação (METCALF e EDDY, 2017).

De acordo com van Haandel e Lettinga (1994), no metabolismo aeróbio convencional cerca de 67% da matéria orgânica é convertida em biomassa celular, pelo processo denominado anabolismo. Esta particularidade tem profundas implicações nos custos de operação dos sistemas aeróbios devido à larga quantidade de lamas excedentárias produzidas diariamente, o que requer um tratamento posterior para garantir o seu acondicionamento de forma segura.

No metabolismo anaeróbio, a conversão de matéria orgânica em biomassa celular não ultrapassa, geralmente 3%, sendo a quantidade restante convertida, por via catabólica, em CH_4 , CO_2 e em produtos finais estabilizados. Desta forma, nos sistemas de tratamento anaeróbio a produção excedente de lamas biológicas é muito menor, reduzindo significativamente os custos de tratamento posterior. Adicionalmente, a produção de CH_4 pode e deve ser encarada como uma fonte energética facilmente disponível para diferentes aplicações (Figura 14), tais como o fornecimento de calor necessário para o processo anaeróbio (SILVA, 2019).

Figura 14. Conversão biológica nos sistemas aeróbios e anaeróbios.



Fonte: Modificado de Chernicharo et al., 2021.

Atualmente, o tratamento anaeróbio continua atraindo a atenção de engenheiros e tomadores de decisão devido ao seu potencial de produzir um combustível renovável útil, como CH_4 e H_2 (LI et al., 2018).

Tabela 1. Vantagens e limitações da digestão anaeróbia

| Vantagens | Limitações |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Baixa produção de biomassa por unidade de matéria orgânica removida; Baixa necessidade de nutrientes inorgânicos em consequência da baixa produção de biomassa; Dispensa de arejamento, reduzindo a potência energética a implementar no projeto; Sub-produção de metano, tipicamente $0,35 \text{ Nm}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \text{CQO}_{\text{rem}}$. Produção de metano, gás combustível de elevado poder calorífico; Possibilidade de manter o estado de dormência dos microrganismos por elevados períodos de tempo, podendo retomar a eficiência de tratamento normal num curto prazo; Elevada densidade de biomassa ativa (1 a 3%) em condições anaeróbias favoráveis; Elevada resistência a choques de carga; Degradação de compostos recalcitrantes e xenobióticos (organoclorados); Baixo consumo de energia; Baixa demanda de área. Aplicabilidade em pequena e grande escala. | <ul style="list-style-type: none"> Menores taxas de redução de substrato por unidade de biomassa; Proliferação de substâncias corrosivas e maus odores, em resultado da produção de ácidos orgânicos e aldeídos; Sensibilidade a compostos inibitórios e tóxicos, tais como oxidantes (O_2, H_2O_2, Cl_2), H_2S, CN^-, SO_3^{2-}; Necessidade de maiores tempos de residência, aumentando o volume do reator; |

Fonte: Adaptado de Chernicharo et al., 2005; Von Sperling (2007); Lettinga et al., 2006.

Há muitas vantagens em usá-lo, incluindo simplicidade, baixos custos operacionais (não são necessários nutrientes e produtos químicos), baixo consumo de energia (não é necessária aeração), baixa produção de lodo e baixos requisitos de espaço (MA et al., 2024; CHEN et al., 2023; CASTELLANO-HINOJOSA et al., 2018).

O conhecimento sobre a organização estrutural e o funcionamento dessas comunidades é essencial para melhorar a eficiência e permitir um gerenciamento de processos apropriado (CARBALLA et al., 2015).

No que se refere ao tratamento de esgotos, os sistemas anaeróbios encontram uma grande aplicabilidade no país, devido às suas vantagens inerentes e às favoráveis condições climáticas de temperatura (VOLSCHAN JR, 2021).

A DA pode ser subdividida em rotas metabólicas, cada uma com grupos microbianos específicos e possuindo um comportamento fisiológico diferente (PEARSE et al., 2007).

O processo anaeróbio biológico (Figura 10) é impulsionado por uma rede complexa de MO pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea, os quais trabalham em conjunto para uma degradação completa dos compostos orgânicos em CH_4 e CO_2 . No processo anaeróbio completo, quatro principais passos metabólicos estão envolvidos: 1-hidrólise, 2-fermentação, 3-acidogênese, 4-metanogênese (TSAPEKOS et al., 2021). Estas quatro etapas envolvem diferentes consórcios microbianos, estando os microrganismos participantes especializados em diferentes processos (LAVERGNE et al., 2018).

- Hidrólise

A hidrólise é um processo endoenergético de desintegração de moléculas complexas solúveis e insolúveis em compostos mais simples. Esses compostos podem então ser transportados para o interior das células para serem utilizadas no metabolismo energético (PARK et al, 2021).

Considerada a etapa preliminar da DA, onde bactérias fermentativas liberam enzimas que permitem às proteínas a degradação a aminoácidos. Além disso, carboidratos são convertidos em açúcares simples e lipídios são transformados em ácidos graxos de cadeia longa e glicerina (ANGELIDAKI et al, 2019).

A taxa da hidrólise pode ser limitante para a velocidade global da DA, a velocidade da conversão de lipídeos, por exemplo, torna-se muito lenta a temperaturas inferiores a 20°C (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994).

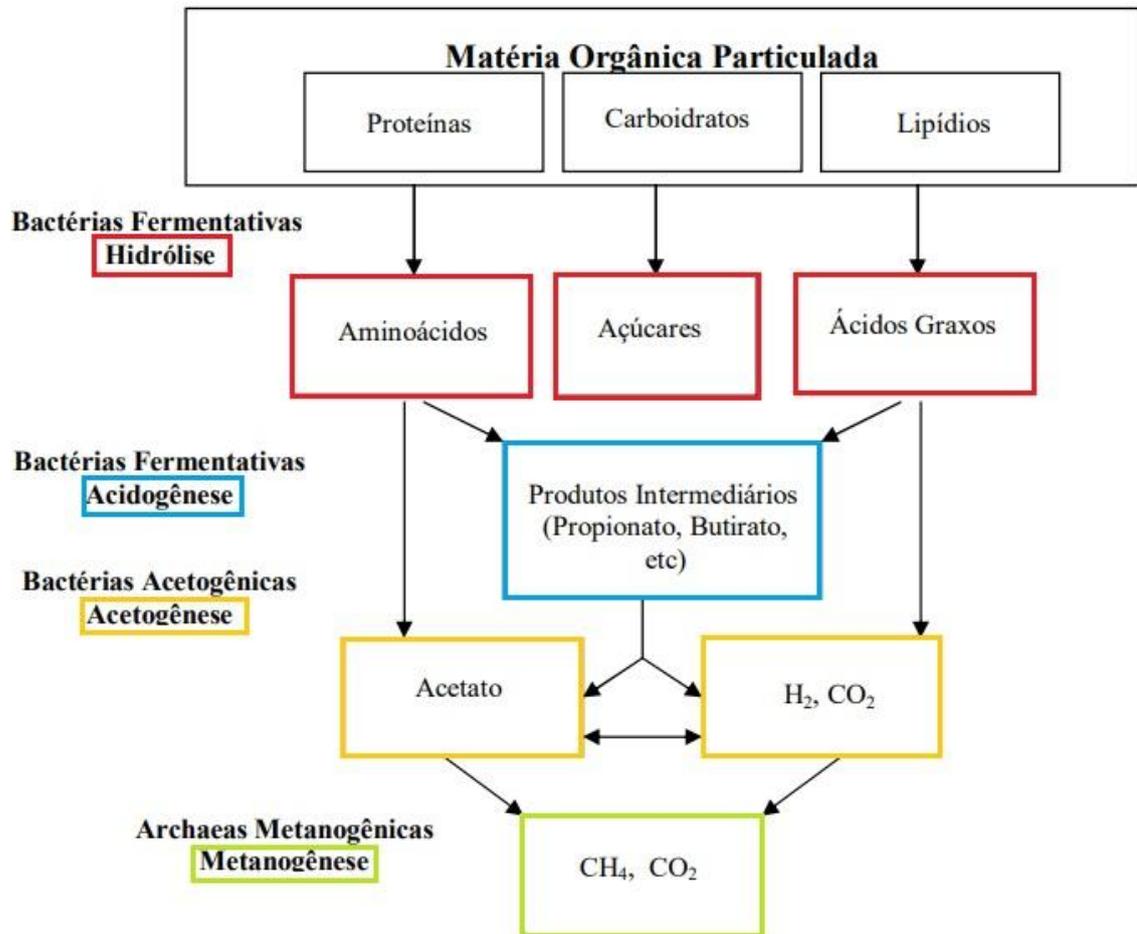
Na anaerobiose, a hidrólise dos polímeros normalmente acontece lentamente e diversos fatores podem afetar a taxa e o grau de hidrólise de um substrato, tais como: temperatura operacional do reator; tempo de residência do substrato no reator; composição do substrato; tamanho das partículas; pH do meio; concentração de NH_4^+ e a concentração de produtos da hidrólise (ácidos graxos voláteis) (ANGELIDAKI et al., 2013).

A hidrólise contribui por reduzir o potencial redox em biorreatores devido ao consumo de oxigênio por microrganismos hidrolíticos anaeróbios facultativos e está intimamente relacionado à acidogênese, uma vez que os mesmos grupos microbianos podem realizar ambos os tipos de reações (KALLISTOVA et al., 2017).

Na fase da hidrólise, os materiais particulados, isto é, os orgânicos complexos (tais como os carboidratos, proteínas e lipídios) são convertidos em materiais orgânicos simples, sendo

dissolvidos em açúcares, aminoácidos, peptídeos, acetatos e hidrogênio, a partir das bactérias fermentativas hidrolíticas (BIELSCHOWSKY, 2014).

Figura 15. Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: Modificado de CHERNICHARO, 2007.

- Acidogênese

Durante a fase acidogênica, os produtos solúveis da hidrólise são metabolizados no interior das células bacterianas fermentadoras facultativas e estritas anaeróbias (maioria), em compostos mais simples.

Os compostos produzidos incluem os ácidos graxos voláteis - AGV's (ácido acético, fórmico, propiônico, butírico e lático), álcoois, o dióxido de carbono, hidrogênio, amoníaco e sulfeto de hidrogênio, e ainda novas células bacterianas (CHERNICHARO, 2007).

Algumas bactérias fermentadoras também podem metabolizar compostos nitrogenados, fenólicos e sulfurados (SEMRAU, 2021). A comunidade acidogênica em sistemas de tratamento anaeróbio são frequentemente altamente diversas, apresentando alta redundância funcional, uma característica que aumenta a resistência dos processos a variações ambientais e permite um vasto espectro de utilização de substratos (DE VRIEZE et al., 2017).

- Acetogênese

Nesse estágio, ácidos orgânicos voláteis, álcoois, aminoácidos e compostos aromáticos resultantes da acidogênese são oxidados, gerando hidrogênio, dióxido de carbono, formiato e acetato (SEMRAU, 2011).

As bactérias acetogênicas são responsáveis por produtos de oxidação gerados na fase acidogênica para gerar o substrato adequado para as arqueias metanogênicas. É a etapa essencial na conversão de compostos intermediários (principalmente propionato e butirato) em ácido acético (FERGUSON, 2018).

Durante a produção dos ácidos acético e propanoico, uma grande quantidade de hidrogênio é formada, fazendo com que o valor do pH do meio fique ácido. No entanto, pelo menos 50% de material biodegradável se torna propionato e butirato que são, em seguida, decompostos a hidrogênio por ação de bactérias acetogênicas (CHERNICHARO, 2005).

O grupo bacteriano desta etapa tem um crescimento relativamente lento, com tempo de duplicação de 1 a 4 dias, pois as reações são mais complexas do ponto de vista energético, podendo ser facilmente interrompidas devido ao acúmulo de H^+ dissolvido no meio (SALOMON, 2007).

- Metanogênese

Os organismos metanogênicos pertencem ao grupo das arqueias, um grupo distinto dos eucariotos e das bactérias. O domínio Archaea apresenta microrganismos adaptados a condições extremas, como elevadas temperaturas e ausência de oxigênio, possuem coenzimas especializadas em reduzir o dióxido de carbono a metano e no transporte de hidrogênio. São organismos muito sensíveis a toxicidade dos ácidos graxos.

Os metanogênicos são diferenciados de acordo com o grupo de substratos utilizados para produzir metano: os hidrogenotróficos (produzem metano a partir da redução de CO_2 pela oxidação do hidrogênio ou formiato); os acetoclásticos, a partir de acetato produzem metano e, os metilotróficos geram compostos metilados, tais como: metanol, metilaminas e sulfetos de metila para gerar metano (KALLISTOVA et al., 2017; THAUER et al., 2008 e YAN AND FERRY, 2018).

A etapa final do processo de DA é efetuada pelas arqueias metanogênicas, sendo subdividida em dois grupos principais, em função da afinidade com diferentes substratos: as acetoclásticas - utilizam ácido acético ou metanol, na formação de metano e as hidrogenotróficas, utilizam hidrogênio e dióxido de carbono para a formação de CH_4 (MAGALHÃES, 2018).

A fase metanogênica é a mais sensível de todo o grupo anaeróbio (ANGELIDAKI et al., 2009). Basicamente o acetato e o H_2 são os dois principais substratos utilizados pelo metabolismo desses mo. As arqueias metanogênicas acetoclásticas utilizam o acetado como fonte de carbono para a produção da maior parte do CH_4 gerado na maioria dos processos anaeróbios e o grupo das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, têm o importante papel na manutenção da pressão parcial de hidrogênio (H^+) no meio (CHERNICHARO, 2007).

Segundo Silva (2019), são dois os papéis desempenhados pelos metanogênicos: produção de metano que possibilita a redução de carbono orgânico, reduzindo o ácido acético

a metano e dióxido de carbono, pela via acetoclástica, e a redução do dióxido de carbono a metano e água, pela via hidrogenotrófica.

1.6 Estação de tratamento de Esgoto

Uma Estação de Tratamento de Esgotos (ETE), segundo a definição da NBR 12.209/2011 é um conjunto de unidades de tratamento, equipamentos, órgãos auxiliares, acessórios e sistemas de utilidades, cuja finalidade é a redução das cargas poluidoras do esgoto e o condicionamento da matéria residual resultante do tratamento.

Nesse sentido, o principal objetivo de uma ETE é aplicar um conjunto de processos e operações unitárias que, quando utilizados de forma sucessiva, serão capazes de remover as cargas poluidoras do esgoto, para então, esse efluente poder ser encaminhado a um corpo receptor minimizando os impactos ambientais.

Tratar esgotos sanitários significa utilizar um ou mais processos que visem reduzir seu teor de agentes contaminantes, de tal modo que os subprodutos finais possam ser reutilizados ou devolvidos ao meio ambiente sem que as características desse meio sejam alteradas negativamente, mantendo o equilíbrio natural do ambiente no entorno. O objetivo principal do tratamento do esgoto é corrigir as suas características contaminantes e poluidoras para que seu uso ou disposição final possa ocorrer de acordo com as regras e critérios definidos pelas autoridades regulamentadoras (MACHADO, 2021).

Os principais constituintes de esgotos, originados de fontes domésticas, são: excreta humana (fezes e urina), águas de banho, resíduos de processamento de alimentos e de produtos de higiene pessoal, podendo estar associado ao esgoto uma grande variedade de outros compostos orgânicos e inorgânicos (antibióticos, pesticidas, microplásticos, carga viral). Considerando a grande variedade de constituintes que podem ser encontrados no esgoto, é prática comum caracterizar o esgoto segundo suas propriedades físicas e seus constituintes químicos e biológicos (METCALF e EDDY, 2017).

O lodo de esgoto é rico em nutrientes e possui alto valor agregado, do ponto de vista da recuperação e da valoração ambiental, a reinserção de nutrientes e metais advindos do esgoto na cadeia produtiva permitiria o fortalecimento da bioeconomia. Fósforo e nitrogênio, nutrientes essenciais para a agricultura, são disponíveis naturalmente em quantidade limitada no planeta. Quando lançados nos sistemas hídricos em excesso, causam eutrofização, afetando negativamente a qualidade da água. A extração de metais de terras raras (Cério, Lantânio, Gadolínio, entre outros), elementos químicos utilizados em componentes tecnológicos, poderiam ser reaproveitados e extraídos do esgoto.

Atualmente, a crescente preocupação com substâncias tais como micropoluentes e microplásticos, antibióticos resistentes e produtos de higiene pessoal lançados juntamente com o sistema de esgotamento doméstico exige cada vez mais um sistema de tratamento em ETE's que esteja relacionado a segurança da saúde humana. As substâncias mencionadas anteriormente permanecem atualmente nos sistemas hídricos, não sendo tratadas. As agências reguladoras não possuem valores estabelecidos para essas substâncias. O tratamento desses compostos químicos está em sua grande maioria no estado da arte de desenvolvimento científico sendo passíveis também de intensa preocupação dos pesquisadores ambientais.

Discute-se também que a DA pode ser aliada na degradação dessas substâncias (ANGELIDAKI et al 2020; CARBALLA et al., 2015) em ETE's em todo o mundo. Compostos recalcitrantes podem ser removidos usando a DA como fenol (NA et al., 2016), bifenil policlorado – PCB (DE LIMA e SILVA et al., 2018), surfactante (DELFORNO et al., 2014), BTEX (DE NARDI et al., 2002), e antibióticos (CHATILA et al., 2015).

As fontes de propriedade físicas utilizadas para caracterizar o esgoto são tanto de origem natural como de origem antropogênica. As demais propriedades físicas do esgoto são derivadas de constituintes adicionados durante o uso, descargas comerciais e industriais, e constituintes encontrados em água infiltrada e infiltração de água subterrânea (METCALF e EDDY, 2017). A saber:

- Sólidos

O esgoto contém diversos materiais sólidos, variando de trapos a material coloidal. Na caracterização do esgoto, geralmente os materiais grosseiros são removidos, antes que as amostras sejam analisadas para sólidos. Tipicamente, cerca de 60% de sólidos suspensos em um esgoto municipal são sedimentáveis.

A análise de teor de sólidos é usada para definir a quantidade de matéria orgânica presente no substrato com potencial para ser biometanizada pelos MO. O teor de sólidos é um parâmetro essencial para a caracterização da matéria orgânica a ser biodigerida e está diretamente relacionado com a quantidade de água presente no substrato, sendo expressa em gramas por litro ou porcentagem (CHERNICHARO, 2007).

Sua definição é fundamental, não apenas para a caracterização dos substratos, mas também para especificação do tipo de tecnologia que será empregada no processo de DA deste substrato. Segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017), há nove frações diferentes de sólidos que podem ser quantificadas em uma amostra de substrato a ser biodigerido.

Basicamente, diferem entre si pelas características de tamanho de partícula e volatilidade: sólidos totais (ST), sólidos fixos totais (SFT), sólidos voláteis totais (SVT), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF), sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos dissolvidos totais (SDT), sólidos dissolvidos fixos (SDF) e sólidos dissolvidos voláteis (SDV).

Os ST, ou simplesmente a matéria seca (MS), são determinados após a secagem de uma amostra do substrato em uma estufa com temperatura de $103^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ até evaporação completa da água. A quantidade de ST é definida pela diferença entre as massas, antes e após da secagem da amostra. ST são obtidos pela evaporação de uma amostra de esgoto até secagem completa e medindo a massa dos sólidos residuais. A etapa de filtração é utilizada para separar os SST dos SDT.

O teste de SST é frequentemente utilizado para avaliar o desempenho de processos convencionais de tratamento e a necessidade de filtração do efluente em aplicações de reuso. Considerado um dos padrões de efluentes universalmente utilizados pelos quais o desempenho de um sistema de tratamento é avaliado para finalidades de controle ambiental.

Materiais que podem ser volatilizados e queimados a $500 \pm 50^{\circ}\text{C}$ são classificados como voláteis. Os SV são assumidos como matéria orgânica e, os SF são os resíduos que permanecem após a incineração de uma amostra. A relação entre SV e ST é, usualmente, utilizada para

caracterizar o esgoto em relação à quantidade de matéria orgânica presente (METCALF e EDDY, 2017).

- Temperatura

A temperatura do esgoto é, normalmente, maior do que a da água de abastecimento. A temperatura varia em função da localização geográfica e da sazonalidade do ano. Como a temperatura em um digestor exerce influência direta na taxa de crescimento biológico e consequentemente no grau de estabilização do lodo e na produção de biogás, é fundamental garantir um sistema de aquecimento tanto para o lodo de entrada como do lodo dentro do digestor, possibilitando assim uma variação mínima de temperatura e a estabilidade do processo (METCALF & EDDY, 2017).

Dos fatores físicos que afetam o crescimento microbiano, a temperatura é um dos mais importantes na seleção das espécies. Os MO não possuem meios de controlar sua temperatura interna e, dessa forma, a temperatura no interior da célula é determinada pela temperatura ambiente externa (CHERNICHARO, 2007). É um fator que afeta a taxa de crescimento e a densidade dos MO, sendo um importante parâmetro na multiplicação dos mesmos, nas reações enzimáticas e na dissociação de compostos (KANG et al, 2021).

Variações bruscas de temperatura interferem na quantidade de CH₄, devido ao desbalanceamento entre as populações de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas (Angelidaki et al., 2019).

Os MO são classificados em: psicrófilos, sobrevivem numa faixa de 0 a 20°C; mesófilos (20 a 45°C) e termófilos (45 a 70°C), sendo que a faixa mesófila e termófila são níveis ótimos de temperatura associados à DA (MATA-ALVAREZ, 2003; METCALF e EDDY, 2017).

Acima de 65°C ocorre a desnaturação das enzimas (KOCH et al., 2019). No entanto, a faixa termofílica apresenta algumas vantagens, tais como uma taxa mais rápida de degradação de resíduos orgânicos, menor viscosidade da efluente e maior taxa de destruição de patógeno (Lin et al., 2017).

Nas últimas décadas, o número de sistemas que operam na faixa termofílica tem crescido em países da Europa, demonstrando maiores taxas de conversão de matéria orgânica em biogás, contudo são sistemas que requerem um maior custo operacional e uma maior demanda energética para o aquecimento do reator (DE BAERE, 2020).

Os constituintes químicos do esgoto são, tipicamente, classificados como inorgânicos e orgânicos. Os químicos inorgânicos incluem nutrientes, metais e gases. As fontes inorgânicas do esgoto derivam das características da água de abastecimento e de adições resultantes do uso doméstico e industrial.

- pH

A concentração da maior parte dos constituintes químicos é dependente da concentração de íons hidrogênio em solução, a concentração de íons hidrogênio é um importante parâmetro. A maneira usual de expressar a concentração de íons hidrogênio é na forma de pH, que é definido como o logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio.

O campo de variação da concentração adequada para a existência da maioria da vida aquática é bastante estreito e crítico (tipicamente 6 a 9). Para metanogênicas o intervalo ideal

considerado é a faixa 6-8. Para efluentes tratados lançados ao ambiente, o campo de variação de valores de pH permitidos, varia entre 6,5 a 8,5.

Segundo Matos et al. (2017) a alcalinização do substrato decorrente ao processo de biodigestão anaeróbia é um fenômeno esperado, pois há a transformação dos ácidos contidos nos afluentes em produtos gasosos.

Em estudos feitos por Hu et al. (2014) tem sido demonstrado que a faixa adequada de pH, aumenta a capacidade de produção de CH₄ pelas arqueias metanogênicas, e o pH muito abaixo ou acima do ótimo, pode causar distúrbios no sistema (JIMENEZ et al, 2020). Valores com pH abaixo de 5,7 são considerados como inibidores, resultando na baixa produção de metano, por afetar o metabolismo das arqueias metanogênicas (MA et al., 2019). Segundo Wang et al. (2014) as condições ácidas contribuem para a etapa de hidrólise e acidificação das macromoléculas e sólidos voláteis dos resíduos, na qual há grandes quantidades de ácidos orgânicos voláteis que tendem a acumular-se e podem provocar uma diminuição significativa do pH que são liberados, devendo manter a alcalinidade em concentrações suficientes para torná-lo o meio tampão (MAGALHÃES, 2018).

- Alcalinidade

A alcalinidade do esgoto se deve a presença de hidróxidos [OH⁻], carbonatos [CO₃²⁻] e bicarbonatos [HCO₃⁻], de elementos como cálcio, magnésio, sódio, potássio e amônia. Desses, o bicarbonato de cálcio e o magnésio são os mais comuns. Boratos, silicatos, fosfatos e compostos similares também podem contribuir para a alcalinidade. A alcalinidade da água auxilia na resistência as alterações do pH causadas pela adição de ácidos (METCALF e EDDY, 2017).

A razão de alcalinidade é uma medida de titulação com ácido sulfúrico e determina a razão da alcalinidade intermediária (IA) causada pelos ácidos orgânicos sobre a alcalinidade parcial (PA) causada pelos bicarbonatos. Na literatura inglesa é chamado de razão IA/PA, entretanto, também são usados outros termos como VFA/bicarbonato, VFA/ALK ou razão Ripley. Na literatura alemã o parâmetro é chamado FOS/TAC (IEA 2013).

- Nitrogênio

O elemento nitrogênio é essencial ao crescimento de microrganismos, são conhecidos como nutrientes ou bioestimulantes. Dados sobre o nitrogênio no esgoto permite avaliar a tratabilidade do mesmo por processos biológicos. Quantidades insuficientes de nitrogênio podem exigir a adição de nitrogênio para tornar o esgoto tratável. A química do nitrogênio é complexa devido aos diversos estados de oxidação que o nitrogênio pode assumir e ainda pelo fato de que essas mudanças podem ser causadas por organismos vivos. As frações orgânicas principais são as de material particulado e material solúvel (CHERNICHARO, 2007).

- Fósforo

Segundo Chernicharo (2007), O fósforo também é essencial para os organismos biológicos e, ao contrário do nitrogênio, não possui uma forma gasosa que possa ser transferido para a atmosfera. O fósforo presente no esgoto pode ser classificado em fração particulada ou dissolvida e, cada uma dessas frações pode ser diferenciada em reativa e não reativa.

- Gases

Os gases comumente encontrados no esgoto bruto incluem N_2 , O_2 , CO_2 , sulfeto de hidrogênio (H_2S), amônia (NH_3) e CH_4 . Os três primeiros são gases da atmosfera e são encontrados em todas as águas expostas ao ar. Os últimos três são derivados da decomposição da matéria orgânica presente no esgoto.

- DQO

A demanda química de oxigênio (DQO) é um parâmetro relacionado à contaminação das águas. A DQO é um indicador de contaminação, quantificando o oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica degradável, bem como os restos de materiais fibrosos e outros (ANGELIDAKI et al. 2018).

O potencial de produção de biogás está relacionado com a matéria orgânica disponível no substrato em termos de ST e DQO (CÓRDOBA et al., 2016). Dessa forma, o total de biogás produzido e o potencial energético em decorrência das reduções de ST e DQO e a análise microbiológica confirmam a eficiência da adoção de biodigestores em ETE como mais uma etapa de tratamento biológico do esgoto (JORDÃO, 2017).

É um parâmetro que indica o total de material quimicamente oxidável na amostra e, portanto, um parâmetro que indica o conteúdo de energia (ou poluição orgânica) de uma matéria-prima. Nesta análise a amostra é refluxada em uma mistura fervente de ácido sulfúrico e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Na etapa seguinte, o dicromato de potássio restante não reduzido é titulado com sulfato de amônio ferroso, o que permite a determinação do oxigênio equivalente consumido (IEA, 2013).

1.7 Potencial Bioquímico do Metano

O potencial bioquímico do metano (BMP) é um teste amplamente utilizado em estudos relativos à DA de sólidos orgânicos. Os testes de BMP podem fornecer informações significativas sobre a produção de CH_4 a partir de substratos específicos e fornecer resultados experimentais essenciais para calibrar e validar modelos matemáticos.

Utilizados, principalmente para determinar o possível rendimento de CH_4 de determinada matéria-prima. Esses testes também fornecem informações sobre a degradabilidade anaeróbia de uma matéria-prima, incluindo a taxa de degradação. Além disso, uma primeira avaliação aproximada da presença de componentes inibitórios pode ser feita (IEA, 2013).

Os experimentos BMP são conduzidos em condições de lote e em escala de bancada, medindo a quantidade máxima de biogás ou de biometano produzido por grama de sólidos voláteis (SV) contido em substratos orgânicos utilizados no processo de DA. Os ensaios de BMP (Figura 17) podem ser utilizados como um índice potencial para a biodegradação anaeróbia, uma vez que é o valor experimental da quantidade máxima de CH_4 produzido por grama de VS. Um substrato orgânico é misturado com um inóculo anaeróbio em condições operacionais e o gás gerado é quantificado.

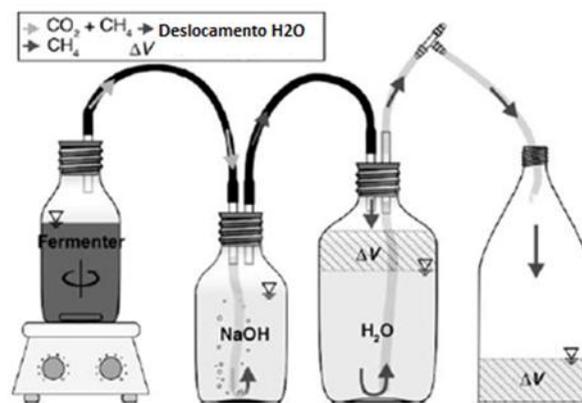
No protocolo para testes BMP deve ser prevista a configuração de todos os parâmetros que podem afetar significativamente os resultados experimentais, tais como: temperatura, pH, intensidade de agitação, físico-química dos substratos, proporção substrato / inóculo (S/I).

As bactérias integrantes no processo de DA são, particularmente, muito sensíveis ao pH (ANGELIDAKI et al., 2009). O quão maior ou mais complexas são as partículas sólidas orgânicas, menor a produção de CH_4 durante a fase inicial, uma vez que o primeiro passo da DA é a desintegração e a hidrólise, sendo esta etapa considerada o passo limitante de todo o processo.

Esses testes determinam a possível produção de CH_4 a partir de um feedstock e também fornecem informação sobre a degradabilidade anaeróbia de um feedstock, incluindo a taxa de degradação. Além disso, pode ser feita uma primeira avaliação grosseira da presença de componentes inibitórios.

O modelo esquemático do experimento BMP (Figura 16) e o resultado hipotético para teste de BMP na Figura 17, onde a produção de metano de esgoto bruto ao longo do tempo é mensurada.

Figura 16. Modelo esquemático protocolo BMP.



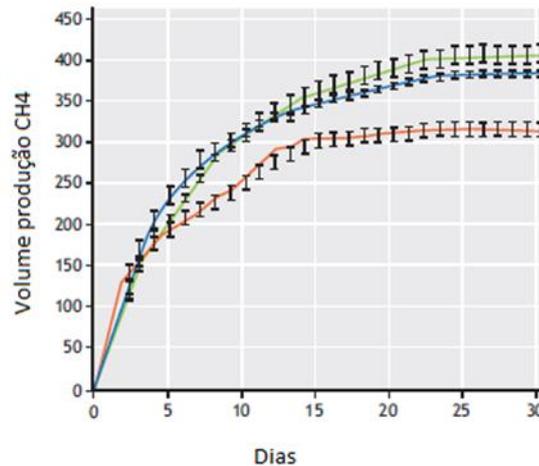
Fonte: Adaptado de Protocolo BMP The Biogas Handbook (WELLINGER et al., 2013).

Para realizar o teste de BMP, os frascos de reação precisam ser incubados na temperatura desejada. A temperatura pode ser mantida constante usando um banho de água termostático. A agitação deve ser realizada por impulsores no frasco de reação. Quando usado biomassa com alta viscosidade em testes de BMP, a agitação insuficiente pode afetar negativamente a digestão. A duração dos testes BMP depende em relação a sua finalidade e às características do substrato (IWA, 2017).

Sabe-se que o O_2 inibe os organismos metanogênicos e consome DQO em uma mistura. Portanto, é necessário remover o O_2 da solução do substrato antes de misturar com a biomassa. A descarga com gás N_2 é comumente aplicada. Adicionar gás N_2 ao substrato por aproximadamente 60 segundos removerá o oxigênio.

Antes do teste de BMP, o sistema de produção de gás e a medição de gás devem ser verificados como um sistema estanque. Este processo pode ser realizado injetando uma quantidade conhecida de ar no tubo conectado e ao medidor de fluxo de gás para verificar se tudo está montado corretamente e à prova de vazamento de gás. A quantidade de ar medida e a quantidade de ar injetado devem ser iguais. Caso contrário, provavelmente há vazamento.

Figura 17. Gráfico hipotético para a produção de metano em dias



Fonte: Adaptado do livro *Experimental Methods in Wastewater Treatments*. IWA, 2017

O ensaio BMP é um método analítico de referência quando o intuito é obter maiores detalhes sobre a transformação de materiais orgânicos em metano (ANGELIDAKI, 2018). O processo de DA é realizado sob condições ótimas de degradação, podendo ser considerado um processo de DA acelerado. Os métodos podem diferir entre si pelo uso de diferentes amostras como substrato ou presença ou não de solução de nutrientes.

Não existe um só parâmetro cuja monitorização permita indicar sistematicamente o mau funcionamento do sistema, sendo antes um conjunto de parâmetros que interagem (ABENDROTH et al, 2017). Parâmetros como a DQO, os SSV e a produção de CH₄ são utilizados habitualmente para avaliar o desempenho dos digestores anaeróbios. Também o pH é um parâmetro relevante para ser medido diretamente e relacionado com a concentração de ácidos voláteis e com a alcalinidade (DE BAERE, 2020).

De forma geral, o bom desempenho do processo anaeróbio depende do equilíbrio dinâmico entre todas as espécies, com especial destaque para o balanço entre acetato produzido e subsequentemente consumido pelas espécies metanogênicas, devido à relação sintrófica (MAO et al., 2019).

Os fatores que determinam o grau de toxicidade de uma determinada substância incluem ainda considerações sobre a capacidade bacteriana de aclimação, sobre o estado estacionário da operação e sobre a eventual presença de mais compostos tóxicos (JIANG et al, 2022).

Segundo o mesmo autor, a toxicidade e a inibição nos digestores anaeróbios podem manifestar-se de forma aguda ou crônica. A primeira resulta na curta exposição de MO não aclimatados ao tóxico, enquanto a segunda resulta em exposições mais prolongadas. Em geral, as populações podem aclimatar-se à toxicidade de duas formas: reparando os sistemas enzimáticos danificados para reajustar o metabolismo em função da presença do tóxico e aumentando a população microbiana para reparar os efeitos tóxicos por uma maior quantidade de células, aumentando a resistência global da comunidade. Estes incluem a inibição do H₂, a inibição do CH₄, a queda da alcalinidade e do pH e o aumento das concentrações de ácidos orgânicos voláteis (AOV).

Um dos mais importantes fatores de instabilidade observados na maioria dos sistemas anaeróbios é a acumulação de produtos intermediários das reações bioquímicas, em consequência das perturbações das condições estacionárias, do pH ou da temperatura. Os compostos intermediários mais importantes são os AOVs, em particular os ácidos acético e propiônico. Quanto maior a quantidade de ácidos voláteis acumulados, maior será o impacto na alcalinidade e no pH do digestor (JIANG et al, 2022).

De acordo com Lettinga (1995), com relação à toxicidade, os organismos anaeróbios, particularmente os metanogênicos, são bastante suscetíveis a uma grande variedade de componentes, sendo inibidos por substâncias presentes no lodo, como amônia, metais pesados, compostos halogenados e cianeto, e pelos subprodutos metabólicos dos MO, como amônia, sulfeto, e os AGVs (ISSAH et al, 2020).

A origem do inóculo deve ser compatível com o tipo de substrato a tratar. O inóculo deve ter abundância e diversidade de MO anaeróbios capazes de acelerar o tempo de biodegradação da matéria orgânica (SILVA, 2014). Para acelerar esse processo é importante encontrar inóculo apropriado que contenha MO necessários para a otimização do processo de degradação, assim como a adequada relação substrato/inóculo (HOLLIGER et al, 2016).

- OLR

A taxa de carregamento orgânico é uma medida da quantidade de matéria orgânica alimentada em um digestor por unidade de volume do digestor (normalmente dada como $\text{kg SV m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, $\text{kg SSV m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, $\text{kg STV m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ou $\text{kg COD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) e representa a quantidade de material orgânico que é fornecido diariamente à usina de biogás. Durante a partida de uma usina de biogás, o OLR é normalmente aumentado lentamente para as condições de trabalho, a fim de adaptar a microbiota ao ambiente operacional. O problema crítico com o OLR é que, se for muito baixo, a produtividade da usina de biogás é baixa e, se for muito alto, pode levar à sobrecarga orgânica e à acidificação. A questão crítica com este parâmetro é que com o aumento do mesmo a possibilidade de acidificação por sobrecarga orgânica aumenta.

- TRH

O tempo de retenção hidráulica (TRH) é o tempo médio durante o qual a matéria-prima permanece no digestor de biogás. Na prática, a grande maioria das usinas de biogás existentes são reatores CSTR (reatores de mistura contínua) e não possuem sistemas especiais de retenção para a microbiota. O tempo de retenção da biomassa em tais sistemas pode ser considerado igual ao TRH. Para o cálculo do tempo de retenção, todas as entradas (matérias-primas e água) para o digestor devem ser consideradas na equação 1:

$$HRT (d) = V_{digestor} / V_{input} \quad (1)$$

Onde:

$V_{digestor}$ o volume total do digestor (m^3)

V_{input} a entrada diária no digestor ($\text{m}^3 \text{ d}^{-1}$)

Em plantas de biogás complexas, caracterizadas por projetos usados para tratamento de águas residuais, o objetivo é reter mo no reator de modo que o tempo de retenção (também

chamado de tempo de retenção de sólidos) seja muito maior que o tempo de retenção hidráulico (tempo de retenção do líquido). Tal projeto de reator é o reator de manta de lodo anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) ou o filtro anaeróbio.

Baixo HRT pode levar a sobrecarga hidráulica, o que leva à lavagem dos mo, enquanto um HRT muito alto leva a uma baixa produtividade (Nm^3 de biogás por m^{-3} de volume do digestor) da planta de biogás. Se forem usadas matérias-primas sólidas, o tempo de retenção pode ser regulado pela quantidade de água fresca ou água de processo usada (por exemplo, a água de processo pode ser a fração líquida do lodo digerido após a separação sólido-líquido, por exemplo, por prensas de parafuso ou centrífugas).

No entanto, como em muitas usinas de biogás os valores de TS devem ser mantidos baixos devido a possíveis problemas de homogeneização em alta viscosidade, as possibilidades de variar o tempo de retenção são limitadas. Além da baixa produtividade, um caldo de fermentação excessivamente diluído produz grandes quantidades de digerido, em comparação com nenhuma ou moderada diluição, com a consequência de que maiores instalações de armazenamento de digerido podem ser necessárias.

Tais experimentos podem fornecer informações significativas sobre a produção de metano a partir de substratos específicos e indicar resultados experimentais essenciais para calibrar e validar modelos matemáticos.

1.8 Modelo computacional Anaerobic Digestion Model N.1 - ADM1

A modelagem matemática destina-se a prever com precisão o comportamento de um sistema, reduzindo significativamente a quantidade de experimentos necessários antes da descrição precisa do sistema, como, por exemplo, equilíbrio de fases ou digestão anaeróbia (GMEHLING et al., 2012; ELADAWY, 2005).

Dados experimentais, determinação dos valores paramétricos, otimizações dos modelos, juntamente com a comprovação da modelagem matemática em relação aos biodigestores, são necessários para a aplicação precisa e eficiente das simulações numéricas (SCHOEN, 2009).

O Modelo de Digestão Anaeróbia No. 1 (ADM1) foi desenvolvido pelo Grupo de Trabalho da International Water Association (IWA) (BATSTONE et al., 2002), e pode ser utilizado como um modelo básico para o cálculo da produção de biogás. Considerado o modelo padrão da indústria para modelar os intrincados processos de digestão anaeróbia, que geram a produção de metano a partir de resíduos e águas residuais. O modelo foi ainda mais aprimorado, resultando na versão BSM2 (Alex et al., 2019) e (Donoso-Bravo et al., 2020), e a versão xp (Allen et al., 2023).

ADM1 é considerado um modelo de simulação confiável, baseado em fundamentos bioquímicos para prever a formação de biogás e um modelo termodinâmico para a correta representação do equilíbrio de fase líquido-vapor, necessário para o cálculo da solubilidade do gás (BATSTONE, 2015). O modelo abrange processos de natureza biológica, química e física.

Neste cenário, são necessários extensos procedimentos de calibração do modelo para melhorar a precisão e sensibilidade (Weinrich et al., 2021). Modelos mecanicistas têm em comum a necessidade de serem cuidadosamente calibrados (Sappl et al., 2023). A simulação computacional (SC) avalia os diferentes processos e variáveis operacionais no desempenho da produção de biogás na AD (Jimenez et al., 2020; Batstone e Viridis, 2014; Batstone, 2015). O

modelo ADM1 tem sido usado por diversos estudos de modelagem na DA de LE (Guo et al., 2023; Garcia-Gen et al., 2021; Maharaj et al., 2019; Urtnowski-Morin et al., 2021; Zhao et al., 2019).

O modelo considera um reator de tanque continuamente agitado contendo águas residuais e 12 grupos bacterianos diferentes que consomem/produzem 12 substratos diferentes. Este cenário é descrito por um sistema de 24 equações diferenciais ordinárias (EDOs). O modelo também considera reações físico-químicas dentro do próprio substrato, aumentando o número de substratos para 23 e aumentando o número total de variáveis de estado a 35. Essas reações físico-químicas são classificadas em duas categorias: reações ácido-base e troca líquido-gás, ambos os quais podem ser resolvidos por meio de EDOs, resultando no sistema total sendo descrito por 35 EDOs.

A forma básica do ADM1 é:

$$\frac{d\vec{u}}{dt} = \mathbf{P}\vec{r}(\vec{u}) + \mathbf{M}_{in}\vec{u}_{in} - \mathbf{M}_{out}\vec{u} \quad (2)$$

Onde

$\vec{u} \in R^{35}$ é o vetor de variáveis de estado contendo a concentração de cada grupo bacteriano e substrato; $\vec{r}(\vec{u}) \in R^{29}$ é um vetor de taxas de reação do processo e depende das concentrações dos componentes (\vec{u}); $\mathbf{P} \in R^{35 \times 29}$ é a transposta da matriz de Petersen, que é uma matriz esparsa que descreve como as concentrações dos componentes afetam as taxas de reação; $\vec{u}_{in} \in R^{35}$ é o vetor de concentrações de afluência; e $\mathbf{M}_{in} \in R^{35 \times 35}$ e $\mathbf{M}_{out} \in R^{35 \times 35}$ são matrizes diagonais da taxa de entrada e saída, respectivamente. \mathbf{P} , $\vec{r}(\vec{u})$, \mathbf{M}_{in} , e \mathbf{M}_{out} contêm os 104 parâmetros do modelo que descrevem o sistema.

- **Processos Bioquímicos**

A fração bioquímica do modelo consiste em uma etapa, em parte não biológica, de desintegração, uma etapa de hidrólise extracelular e três etapas intracelulares: acidogênese, acetogênese e metanogênese. Esses processos não ocorrem de forma estritamente sequencial, algumas das reações de hidrólise, acidogênese e acetogênese acontecem simultaneamente. Resumidamente, a evolução da carga orgânica ocorre da seguinte forma: (i) Compósitos se desintegram em carboidratos, proteínas, lipídios, inertes solúveis e particulados; (ii) Hidrólise de carboidratos, proteínas e lipídios em monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos de cadeia longa (LCFA); (iii) Absorção de açúcares, aminoácidos e LCFA, gerando crescimento do respectivo grupo bacteriano consumidor e produção de valerato, butirato, propionato, acetato e hidrogênio; (iv) Absorção de valerato, butirato e propionato, gerando crescimento do respectivo grupo bacteriano consumidor e produção de acetato e hidrogênio; (v) Absorção de acetato e hidrogênio, gerando crescimento do respectivo grupo bacteriano consumidor e produção de metano e, (vi) Morte de MO consumidores, gerando novamente compósitos e, mantendo o balanço de massa do sistema. Os componentes orgânicos são quantificados por sua demanda química de oxigênio (KgCOD/m³).

- **Processos físico-químicos**

Os processos físico-químicos no ADM1 incluem reações ácido-base, bem como o equilíbrio de compostos de carbono e nitrogênio, como o dióxido de carbono e o amoníaco. O pH no modelo afeta as taxas das reações biológicas. O transporte de alguns gases dissolvidos entre a fase líquida e gasosa também é descrito pelo modelo. O processo é considerado de forma dinâmica, permitindo que haja supersaturação de alguns componentes na fase líquida.

O reator é simulado de forma homogênea independente de sua forma de operação, ou seja, os valores das variáveis são únicos para qualquer ponto interno a uma fase (líquida ou gasosa), havendo apenas dependência temporal (e não espacial). Fica configurada, desta forma, uma suposição de mistura perfeita.

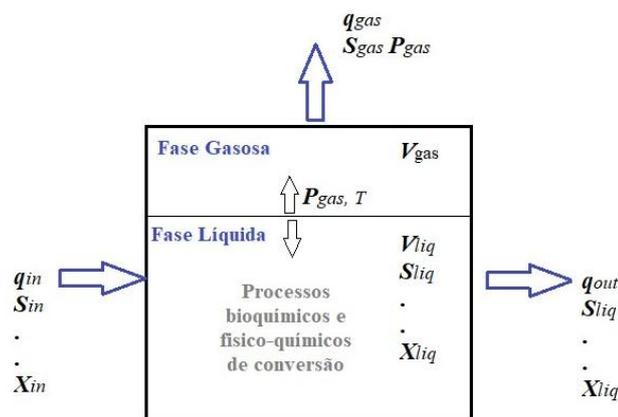
O sistema a ser considerado no modelo ADM1 é um reator com *input*, *output* e volume do líquido constante ($q_{out} = q_{in}$, Figura 18).

O influente contendo certa concentração de material solúvel (S_{in}) e particulado (X_{in}) chega a fase líquida de volume V_{liq} do reator com vazão q , onde inicialmente existe uma concentração S_0 de material solúvel e X_0 de material particulado. Os processos biológicos e físico-químicos ocorrem dentro da fase líquida homogênea.

O efluente sai do reator com fluxo q contendo material solúvel de mesma concentração do interior do reator (S) e uma fração do material particulado ($f.X$). Alguns gases gerados pelas reações na fase líquida são transportados para a fase gasosa de volume V_{gas} . Os componentes da fase gasosa deixam o vaso do reator com fluxo q_{gas} contendo S_{gas} .

A força deste modelo está na consideração de sete frações de biomassa separadas e seu decaimento, além de incorporar quatro estágios principais de degradação anaeróbia, e dividi-los em 31 processos, onde 19 deles são diferenciais e 12 são equações algébricas, e 33 grupos de frações, onde 24 são as variáveis de estados dinâmicos, acopladas a 105 parâmetros cinéticos e estequiométricos (BATSTONE et al., 2002).

Figura 18. Esquema de um típico digestor de tanque simples utilizado como base no modelo ADM1.



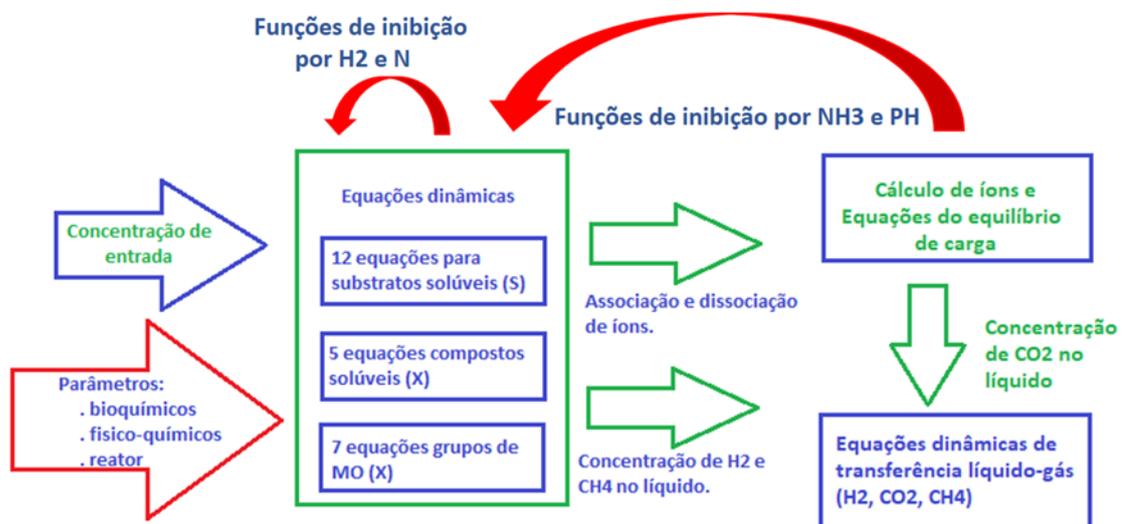
Fonte: Adaptado de Batstone, 2000

A utilização de equações algébricas para processos de dissociação e associação, que expressam concentração de íons de hidrogênio, amônia livre, AGV (ácidos graxos voláteis) e CO_2 , são calculados. Consequentemente, como reações físico-químicas, os compostos gasosos (CO_2 , CH_4 , H_2 e vapor de água) são avaliados (SCHOEN, 2009).

Os 19 processos biológicos presentes têm suas taxas cinéticas (ρ_j) descritas por um de dois formatos: Primeira ordem ou Monod com saturação de substrato. Os modelos de processos biológicos baseiam-se em dois conceitos fundamentais: a concentração de substrato (S) e a concentração de microrganismos (X).

Estas variáveis relacionam-se por meio de duas relações fundamentais: a velocidade de degradação de substrato (n) e a velocidade de crescimento de microrganismos (m). O estudo da cinética caracteriza-se pela relação entre a concentração de um determinado substrato e a sua taxa de utilização pelos MO (SILVA, 2007). A Figura 19 descreve as etapas do processo no ADM1.

Figura 19. Etapas do processo no modelo ADM1



Fonte: Adaptado de Silva, 2007.

- Cinética de Primeira Ordem (Processos j 1 ao 4 e j 13 ao 19)

A taxa na qual os produtos são gerados é diretamente proporcional à concentração do reagente. Usado para descrever processos de desintegração, hidrólise e morte bacteriana.

$$p_j = K_j X_j \quad (\text{Equação 3})$$

- Cinética de Monod com Saturação de Substrato (Processos j 5 ao 12)

A taxa na qual os produtos são gerados é diretamente proporcional a concentração do grupo bacteriano consumidor vezes o substrato sobre o qual esse grupo age corrigido para a saturação do mesmo. Modelo utilizado para descrever a absorção de nutrientes pelas bactérias.

$$p_j = K_{m_j} \frac{S_j}{K_{s_j} + S_{s_j}} X_j \quad (\text{Equação 4})$$

Amplamente utilizadas, as equações cinéticas empíricas assumem que o passo limitante da DA para maioria dos substratos solúveis é o passo final – a metanogênese. Utilizando modelos baseados na cinética de Monod, a velocidade específica máxima depende da natureza do substrato, mas também das capacidades das espécies metanogênicas. Em muitas situações, a formação de CH₄ valida o modelo global do processo anaeróbico, e os coeficientes cinéticos obtidos irão refletir, em grande parte, o comportamento metanogênico (BATSTONE et al, 2015).

Os modelos cinéticos que consideram o crescimento biológico relacionam velocidades de crescimento celular com a concentração de substrato. Nestes modelos a produção de células é caracterizada por massa celular ou concentração. Os substratos presentes no lodo são, geralmente, a principal fonte de carbono e/ou energia. Em meios complexos, o substrato considerado é aquele que limita a velocidade de crescimento celular. A concentração de substrato pode ser expressa em termos de demanda química de oxigênio (DQO) ou carbono orgânico total (COT), no caso de tais substratos complexos.

O metabolismo bacteriano recebeu grande atenção durante vários anos por parte de pesquisadores. O principal objetivo era derivar as expressões cinéticas para descrever o metabolismo dos MO. Muitas dessas expressões se baseiam no trabalho original de Monod (1950), que pesquisou a fermentação alcoólica de açúcares em sistemas alimentados continuamente. O modelo cinético de Monod é similar a modelos desenvolvidos *a priori*, tais como, as isotermas de adsorção de Langmuir (1918) e o modelo cinético de Michaelis-Menten (1913) desenvolvido para reações enzimáticas com um único substrato.

Em referência aos artigos de Monod (1949, 1950), os resultados podem ser resumidos em três equações básicas: (i) A velocidade do crescimento dos MO é proporcional à velocidade de utilização do substrato (eq. 1); (ii) A velocidade de crescimento dos MO é proporcional à concentração dos mesmos e depende da concentração de substrato (eq. 2) e, (iii) Paralelo ao crescimento dos MO ocorre o decaimento dos mesmos devido a morte de algumas células. A velocidade de decaimento pode ser formulada através de um processo de primeira ordem.

$$\left(\frac{dC_x}{dt}\right) c = Y_x \left(\frac{dC_s}{dt}\right) u \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

C_x é a concentração de microrganismos;

C_s é a concentração de substrato;

t é o tempo;

YX/S é o fator de crescimento ou a produção bruta de bactérias por unidade de massa de substrato e;

O índice c representa o crescimento das bactérias e o índice u , a utilização do material orgânico.

$$r_x = \left(\frac{dC_x}{dt} \right) c = C_x \cdot \mu = \mu_{max} \frac{C_S \cdot C_X}{K_S + C_S} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde

r_x é a velocidade de crescimento celular;

μ é a velocidade específica de crescimento celular; e

μ_{max} e K_S são constantes cinéticas. μ_{max} a velocidade máxima de crescimento celular e K_S a constante de saturação do substrato e possui o valor da concentração de substrato na qual μ atinge metade do seu valor máximo.

A representação gráfica da expressão cinética de Monod é apresentada na Figura 20.

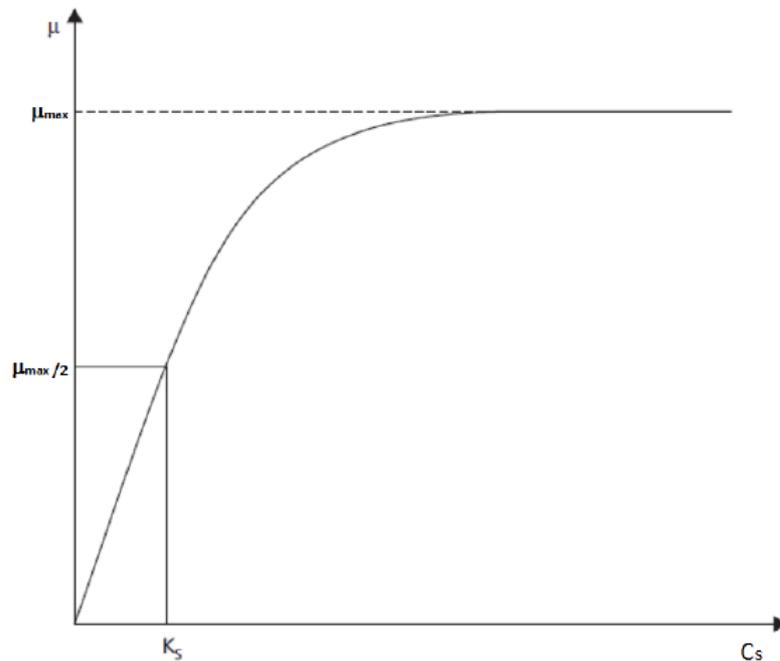


Figura 20. Representação gráfica do modelo cinético de Monod (1950).

Concentrações elevadas de substrato, a razão $C_S/(C_S+K_S)$ se aproxima de uma unidade e que, portanto, a velocidade de crescimento se torna independente da concentração de substrato, isto é, o crescimento apresenta uma cinética de ordem zero. Por outro lado, se a concentração de substrato for muito baixa, isto é, se $C_S \ll K_S$, a velocidade de crescimento se torna proporcional à concentração de substrato, o que caracteriza cinética de primeira ordem.

$$\left(\frac{dC_x}{dt}\right) d = -C_x \cdot K_d \quad (\text{Equação 7})$$

Onde

K_d é a constante da velocidade de decaimento ou constante de lise celular e;

O índice d representa o decaimento da massa bacteriana.

Enzimas intracelulares ou extracelulares geradas por MO são utilizadas durante a conversão bioquímica. Essas enzimas aumentam a biodisponibilidade dos substratos para a digestão por MO. O passo extracelular inclui desintegração e hidrólise e, as fases de acidogênese, acetogênese e metanogênese pertencem ao passo intracelular. Os processos não biológicos, como a fase líquido - líquido e também as reações da fase gás - líquido, são como conversões físico-químicas (BATSTONE, 2002).

A primeira etapa do processo extracelular é a desintegração, sua inclusão no ADM1 foi inovadora, pois permite diversificar a aplicação do modelo para diversos fins, tais como, representar à quebra de moléculas complexas presentes no lodo biológico (SILVA, 2015).

Devido à sua capacidade de descrever a taxa e a composição da produção de biogás, desde 2002 o ADM1 é amplamente utilizado como um modelo de degradação anaeróbia para diferentes substâncias e fluxos de processo.

Esse modelo bioquímico também foi aplicado com sucesso a diferentes processos anaeróbios, como a DA em diferentes fases de temperatura (HIDAKA et al., 2022; LOHANI et al., 2018), na produção de ácidos voláteis (NABATEREGA et al., 2023; SANJAYA et al., 2023), em sistemas sólidos de dois estágios (BIAŁOBRZEWSKI et al., 2024; CREMONEZ et al., 2021;), em reator em batelada com armazenamento microbiano (DE CRESCENZO et al., 2022; SHAYAN et al., 2022) e também reatores UASB de alta taxa (SILVA NETO et al., 2019).

O ADM1 modificado também foi apresentado como uma ferramenta para apoiar a tomada de decisões e o planejamento de usinas de energia de biogás (RIEKE et al., 2018) e utilizado para avaliar o desempenho de processo em usinas de biogás (BENSMANN et al., 2016; OZGUN et al., 2019).

1.9 Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de comunidades microbianas no processo de digestão anaeróbia

As abordagens moleculares permitem a detecção de MO não cultiváveis e a classificação de organismos cultiváveis, uma vez que a morfologia e a fisiologia desses organismos não são suficientes para distinguir diferentes taxas. Apesar de várias biomoléculas poderem ser potencialmente utilizadas como marcadores moleculares, o trabalho de Woese & Fox (WOESE & FOX, 1977) identificou o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (rrs) como uma sequência singular para análises filogenéticas.

Diversos fatores tornam esse gene ideal para o estudo de relações evolutivas: (i) está presente em todas as bactérias; (ii) apresenta regiões conservadas e regiões variadas, o que torna possível o desenho de iniciadores e sondas com diferentes níveis de especificidade; (iii) possui

diferenças em suas sequências permitindo análises filogenéticas e; (iv) está presente em grande número de cópias nas células, o que facilita a sua detecção (TREU et al, 2016).

O uso do 16S rRNA para acessar a diversidade microbiana em ambientes naturais foi aplicado pela primeira vez por Pace e colaboradores (1986) e desde então vem revolucionando a visão a respeito da diversidade dos MO no planeta Terra. A análise de sequências de genes é a abordagem mais comum para o estudo de comunidades microbianas.

No entanto, os dados obtidos pela identificação de bactérias pelo 16S rRNA são muito pouco informativos a respeito das funções metabólicas desempenhadas por esses MO nos ecossistemas. Bactérias filogeneticamente próximas podem apresentar metabolismos bastante distintos e desempenharem papéis diferentes em uma comunidade de MO. Neste sentido, a utilização de genes funcionais, que codificam enzimas chaves dos ciclos biogeoquímicos, é uma abordagem mais adequada para o estudo das funções microbianas no ambiente.

Diversos genes vêm sendo exaustivamente estudados, já havendo banco de dados robustos de suas sequências, o que viabiliza ainda mais a validação dos resultados. A técnica de PCR em tempo real é bastante utilizada nesses estudos, uma vez que, além de detectar a presença dos genes, possibilita a quantificação dos mesmos, o que resulta em uma melhor compreensão do potencial metabólico dos MO.

Este recente dilúvio de sequenciamento de dados revelou a posição chave que Archaea ocupa na Árvore da Vida. Estando na encruzilhada de grandes eventos evolutivos, as archaea são cruciais não só para a compreensão da origem dos eucariontes, mas também para a nossa compreensão de eventos anteriores na evolução da vida celular na Terra, nomeadamente a natureza do último ancestral comum universal de toda a vida (LUCA) (WEISS et al, 2016).

A descoberta de novas linhagens metanogênicas através de métodos moleculares robustos revela a complexidade em estrutura e funções da comunidade microbiana em ambientes naturais e em biodigestores anaeróbios. No entanto, uma visão abrangente dessas comunidades ainda se faz necessária para melhorar os processos atuais de produção de biogás (NAKAYAMA et al., 2019).

1.10 Organismos metanogênicos

A árvore filogenética dos seres vivos (Figura 21), baseada no sequenciamento genético da subunidade 16S do RNA ribossômico demonstra que os MO produtores de CH₄ fazem parte do domínio Archaea.

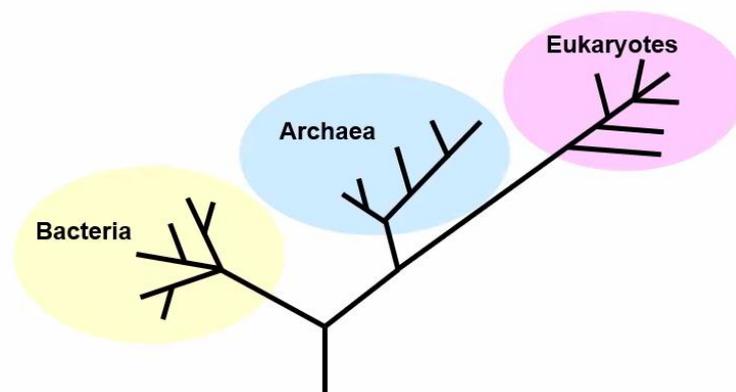


Figura 21. Os três domínios da vida. Carl Woese e Jorge Fox 1977, adaptado.

As arqueas metanogênicas são fisiologicamente especializadas na conversão de substratos simples, limitando-se a três substratos principais: CO₂, acetato e compostos contendo grupos metilados, transformando-se em CH₄, portanto, as arqueas são dependentes de outros MO capazes de realizar a quebra de moléculas complexas em suprimentos de substrato (SARMIENTO et al. 2011).

A metanogênese é um dos metabolismos mais antigos da Terra (LIU et al., 2012), realizada por organismos procariotos pertencentes ao táxon Euryarchaeota, os quais produzem CH₄ como o produto final de seu metabolismo (LIU & WHITMAN, 2008). O processo de metanogênese é a única maneira de obter energia para o crescimento de arqueas, e estes são os únicos MO conhecidos capazes de produzir CH₄ como produto do processo metabólico (NAKAYAMA et al., 2019).

As arqueias metanogênicas ocupam uma ampla variedade de ambientes estritamente anaeróbios, sendo sua ocorrência descrita em ecossistemas naturais ou antropogênicos, tais como: zonas úmidas, arrozais, solos de tundra, sedimentos e ambientes aquáticos salinos e corpos de água doce, sedimentos marinhos, permafrost, trato intestinal de ruminantes e alguns insetos, corpo humano, estações de tratamento de águas residuais, aterros, reservatórios de hidrelétricas e fontes hidrotermais (BOETIUS et al., 2015; CONRAD, 2007; ENZMANN et al., 2018; KALLISTOVA et al. 2017; MARTIN et al., 2008; SAIA et al., 2011).

A diversidade das comunidades metanogênicas pode atingir milhares de espécies microbianas em diferentes sistemas e ambientes (GÜLLERT et al., 2016). Possuem enzimas essenciais à síntese do CH₄ que podem servir como biomarcadores (ALCANTARA, 2007).

A última década revelou a diversidade e a onipresença das archaea na natureza, o crescimento acelerado de estudos científicos destaca sua importância na ecologia, na biotecnologia e na área da saúde humana (VAN WOLFEREN et al. 2022).

Archaea são MO procarióticos unicelulares, que à primeira vista se assemelham a bactérias, pois não possuem compartimento nuclear ou sistemas endomembrana complexos, possuem genomas circulares que codificam os genes.

Surpreendentemente, os mecanismos que as archaea utilizam para replicar e expressar a informação genética, isto é, replicação, transcrição e tradução do DNA, estão evolutivamente mais relacionados com os encontrados nos eucariotos do que com os das bactérias (Fig. 22). Ao mesmo tempo, as archaea também compartilham um conjunto de características celulares comuns que as separam dos eucariotos e das bactérias. Essas características incluem membranas distintas feitas de lipídios compostos por cadeias isoprenóides ligadas por éter a uma estrutura de glicerol-1-fosfato, um aparelho de motilidade único chamado arqueolo e tipos únicos de metabolismo, como a metanogênese (VAN WOLFEREN et al. 2022).

Há uma década atrás, todos os metanogênicos conhecidos pertenciam a seis ordens do filo Euryarchaeota: Methanobacteriales, Methanococcales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanopyrales e Methanocellales (DWORKIN et al. 2006; SAKAI et al. 2008). Em 2012, uma nova ordem, Methanomassiliicoccales, pertencente à classe Thermoplasmata foi revelada (DRIDI et al. 2012; IINO et al. 2013) e desde então, com os avanços na filogenética e análises genômicas, o conhecimento sobre Archaea se expandiu rapidamente.

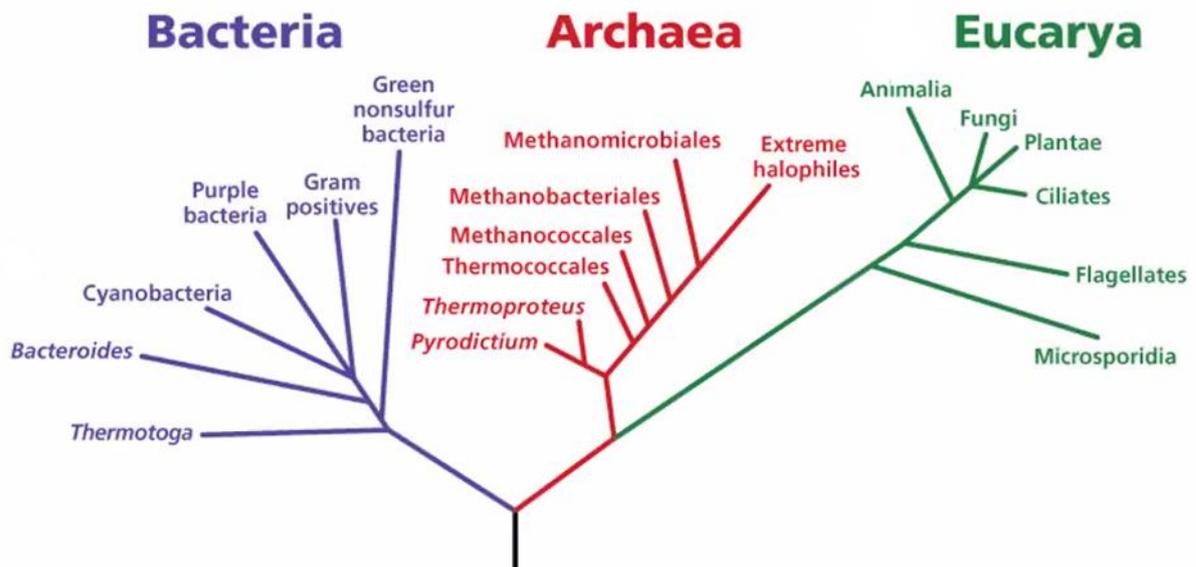


Figura 22. Os três domínios da vida. Carl Woese e Jorge Fox 1977, adaptado.

Duas novas classes no Filo *Euryarchaeota* foram propostas (*Methanofastidiosa* e *Methanonatronarchaeia*) e genes que codificam o complexo McrA e para o metabolismo de compostos metilados foram encontrados no Filo *Bathyarchaeota* e *Verstraetearchaeota* (Spang et al. 2017).

Muitos metanogênicos são mesofílicos, como *Methanosarcina*, a maioria dos *Methanococcus* e *Methanobacterium*. O registro de crescimento em altas temperaturas pertence a *Methanopyrus kandleri*, capaz crescer a 122 °C, sob alta pressão (Takai et al. 2008). Um novo gênero de metanogênico hidrogenotrófico não cultivado também foi descrito em descongelamento permafrost (*Methanoflorens stordalenmirensis*), o qual possui genes para a utilização de H₂, formato e formaldeído (MONDAV et al. 2014). Outros metanogênicos extremófilos incluem o halofílico *Methanosarcina mazei* (ENZMANN et al. 2018) e *Methanonatronarchaeia*, metilotrófica hipertermófila (SOROKIN et al. 2017).

Os metanogênicos mais conhecidos pertencem às classes Euryarchaeota, os quais produzem CH₄ a partir de vias acetoclásticas, hidrogenotróficas ou metilotróficas.

- Rota metabólica hidrogenotrófica

Segundo Liu (2012), a rota hidrogenotrófica é considerada a rota mais antiga em termos de evolução e está presente em praticamente todos os grupos de arqueias metanogênicas (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* e *Methanosarcinales*).

Os metanogênicos hidrogenotróficos comuns encontrados em biorreatores de DA incluem espécies de *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum* e *Methanothermobacter*.

De acordo com Liu et al (2016), as arqueias hidrogenotróficas possuem importante contribuição na produção de CH₄ nos sistemas de alta carga orgânica, em virtude da baixa

afinidade pelo acetado, suportando elevadas concentrações desse ácido, e apresentam maior taxa de crescimento específico em comparação às acetoclásticas. Sob altas concentrações de AGV e baixos valores de pH, os metanogênicos hidrogenotróficos, mais tolerantes ao estresse, dominam as vias metabólicas (FOTIDIS et al., 2014 e GOUX et al., 2015).

O CO_2 é reduzido a CH_4 por metanogênicos hidrogenotróficos, utilizando H_2 como doadores primários de elétrons (SCHNÜRER and JARVIS, 2018).

- Rota metabólica acetoclástica

Os metanogênicos acetoclásticos são representados pelos gêneros *Methanosarcina* e *Methanotherix*. *Methanosarcina sp.* é um gênero versátil, incluindo espécies capazes de crescer em diferentes substratos, incluindo acetato, metanol, metilaminas, H_2 e CO_2 , enquanto *Methanosaeta sp.* usa apenas o acetato. *Methanosaeta sp.* possui ampla distribuição e, devido à alta afinidade pelo acetato, supera *Methanosarcina sp.* em ambientes com baixo acetato (CONKLIN et al. 2006).

Embora apenas dois gêneros, conhecidos até o presente momento (*Methanosarcina* e *Methanosaeta*) utilizem acetato como substrato, até dois terços do CH_4 gerado biologicamente é derivado do acetato (NARAYANAN et al. 2009). As arqueias acetoclásticas crescem lentamente, com tempos de duplicação de 1 a 12 dias para *Methanosaeta* e 0,5 a 2 dias para *Methanosarcina* (DE VRIEZE, 2014). Apesar da restrita faixa de substratos utilizados, as arqueias metanogênicas são filogeneticamente muito diversas (WHITMAN et al., 2006).

Metanogênicos acetotróficos são encontrados em *Methanosaeta* (um gênero de metanogênicos acetoclásticos obrigatórios) e *Methanosarcina* (um gênero de metanogênicos acetoclásticos facultativos). *Methanosaeta* só pode usar acetato como substrato, e cresce muito lentamente, mas tem alta afinidade pelo acetato, então se propaga e domina quando a concentração de acetato é baixa. *Methanosaeta* pode ter morfologia filamentosa (e por isso foi inicialmente nomeado como *Methanotherix*) desempenha um papel importante na granulogênese de grânulos ou agregados anaeróbios.

As espécies de *Methanosarcina* podem utilizar uma gama mais ampla de substratos, incluindo metanol, metilamina, sulfetos de metila, H_2 e CO_2 , além do acetato. Ao contrário da espécie *Methanosaeta*, a espécie *Methanosarcina* pode crescer rapidamente, mas tem uma afinidade menor para o acetato, de modo que pode competir com *Methanosaeta* quando a concentração de acetato é alta.

Na metanogênese que utiliza acetato (acetoclástico), o acetato é dividido em um grupo metil e CO_2 , e o grupo metil é posteriormente reduzido a CH_4 utilizando um elétron fornecido pelo grupo carboxila (WESTERHOLM et al, 2019).

- Rota metabólica metilotrófica

A via metabólica onde compostos contendo grupos metil, como metilaminas e metanol, são usados como substratos para a produção de CH_4 pelas archaea metanogênicas é conhecido como metilotrófico (VANWONERGHM et al., 2016). A maioria dos metanogênicos metilotróficos obtém os elétrons de que necessitam para a redução da oxidação de grupos metil adicionais a CO_2 (SCHNÜRER and JARVIS, 2018). A formação de metano a partir de

compostos metilados é realizada por membros dos *Methanomassiliicoccales*, *Methanobacteriales* e *Methanosarcinales*.

Em suma, existem três tipos conhecidos de metanogênicos: acetoclástico, hidrogenotrófico e metilotrófico. Os metanogênicos acetoclásticos convertem o acetato em CH₄ e CO₂, os metanogênicos hidrogenotróficos utilizam H₂ ou formato para reduzir CO₂ a CH₄, e os metanogênicos metilotróficos produzem CH₄ a partir de compostos de metila, como metanol, metilaminas e metilsulfetos.

Em todas as vias metabólicas do processo de metanogênese estão envolvidas várias reações catalisadas por enzimas, mas uma enzima específica desempenha um papel neste processo de conversão, a enzima metil-coenzima M redutase, que participa da última etapa da metanogênese, sendo o gene *mcrA* uma unidade da subunidade alfa do MRT, e está presente exclusivamente em archaea metanogênicas (ARONSON et al., 2013).

Moissl-Eichinger et al (2018) identificam alguns fatores importantes que tendem a influenciar a biologia dos metanogênicos, como a pressão energética derivada do ambiente, a capacidade de troca de metabólitos e elétrons, a adaptação genômica e a capacidade estrutural, a facilitação horizontal na transferência de genes, o papel fundamental da sintrofia e características estruturais da célula (formação de apêndices especiais da superfície celular, como nanofios, parede celular e envelope e a dupla membrana arqueal).

Embora os processos metanogênicos sejam importantes para o tratamento de águas residuais, produção de biogás e outras aplicações biotecnológicas, a compreensão detalhada de como os metanogênicos interagem com seu ambiente e com outros organismos permanece uma caixa preta para microbiologistas e engenheiros (NAKAYAMA et al., 2019). Apesar de anos de esforços dedicados à compreensão dos processos metanogênicos em diversos sistemas, sua dinâmica complexa ainda exige investigação aprofundada.

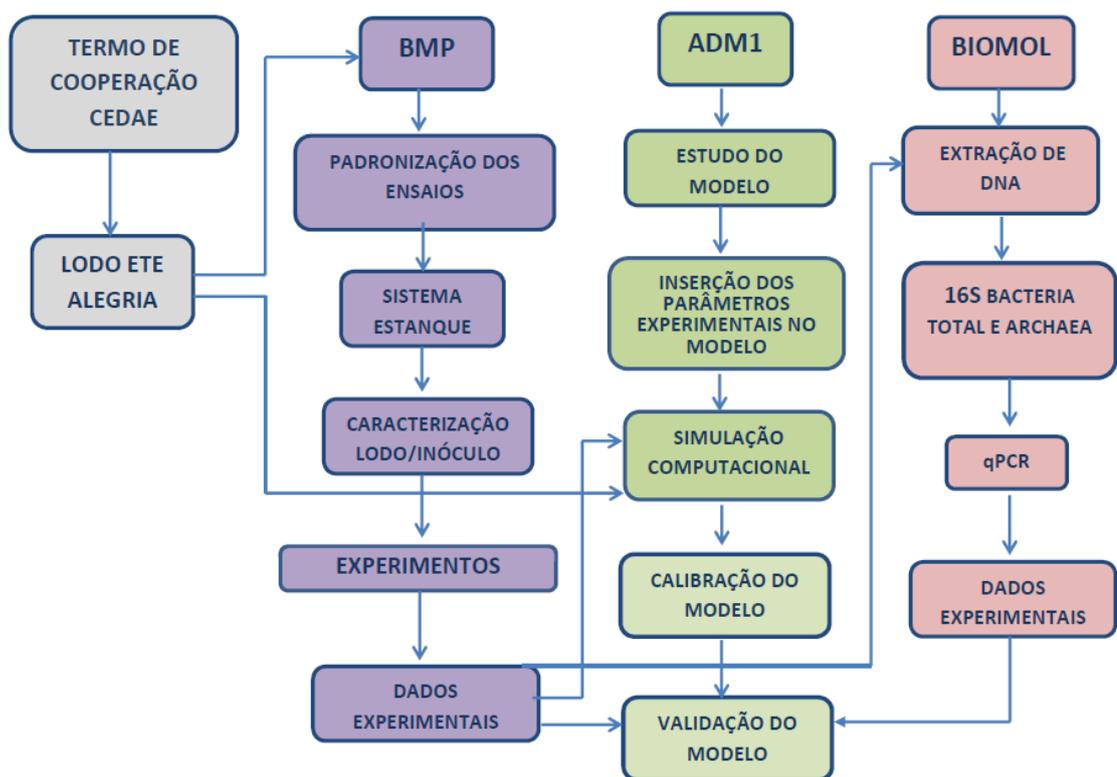
CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Fluxograma de pesquisa

A Figura 22 ilustra o fluxograma da metodologia de pesquisa.

Figura 22. Fluxograma com as etapas de execução da pesquisa.



Fonte: a autora.

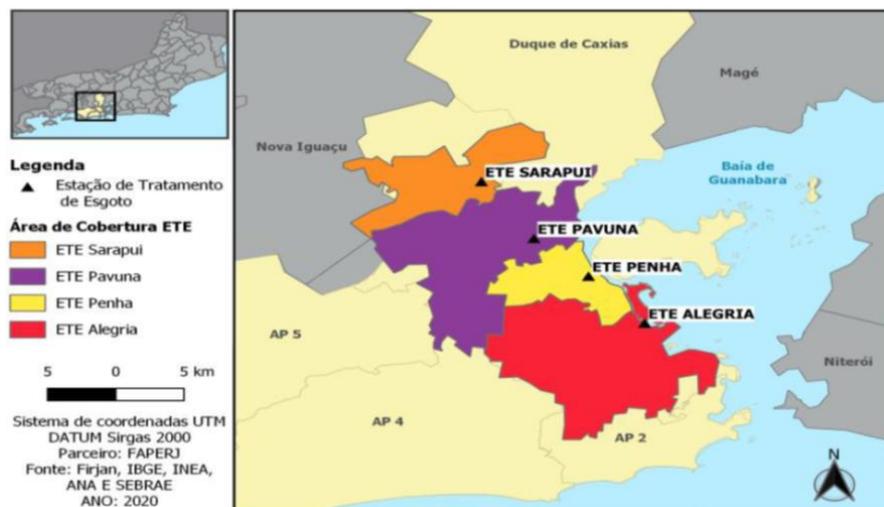
2.2 Estação de tratamento de esgoto Alegria

A estação de tratamento de esgotos Alegria fica localizada na região metropolitana do município do Rio de Janeiro, situada no bairro do Caju, na zona portuária e recebe o esgoto

doméstico produzido na região metropolitana do município, sendo a maior do Estado do Rio de Janeiro (Figura 23). Atende a partes da Zona Norte e do Centro do município do Rio.

O esgoto é coletado de quatro sub-bacias principais: o Conjunto Centro, Mangue e Catumbi; Alegria; Faria-Timbó e São Cristóvão. A bacia de esgotamento sanitário abrange uma área contribuinte de 8.634 ha.

Figura 23. Localização das ETEs e suas bacias de esgotamento.



Fonte: Adaptado de INEA, 2020.

Inaugurada em 2009, a ETE-Alegria possui capacidade instalada de 5.000 L/s, tratando 2,5 m³/s e servindo a uma população de 1.500.000 hab. A estação foi construída dentro do escopo do Plano de Despoluição da Baía de Guanabara (PDBG). Localiza-se nas coordenadas geográficas 22°52'15"S / 43°13'38"W. A Figura 24 apresenta uma vista aérea da ETE Alegria.

A ETE-Alegria (Figuras 24 e 25) possui planta de operação (Figura 26) constituída pelas seguintes etapas de tratamento:

i. Tratamento preliminar: o esgoto bruto afluente à ETE, proveniente dos troncos coletores, é bombeado a uma elevatória de esgotos com quinze metros de altura iniciando o processo de tratamento. No gradeamento de resíduos sólidos são retidos os sólidos grosseiros (garrafas pets, sacos plásticos, estopas, etc.) e é realizada também, a remoção de areia, pelos desarenadores ou caixas de areia;

ii. Tratamento primário: o esgoto segue para os decantadores primários. Nesta unidade ocorre a decantação dos sólidos sedimentáveis levando à formação do lodo bruto, que é coletado e bombeado para o processo de adensamento.

Nos adensadores, o lodo bruto é submetido ao adensamento por gravidade que reduz sua umidade, para que possa ser encaminhado ao processo de biodigestão. Nos biodigestores (Figura 27), fechados hermeticamente, ocorre a homogeneização do lodo anaeróbico com o lodo adensado (lodo cru) e escumas.

Figura 24. Estação de tratamento de esgotos Alegria



Fonte: GoogleEarth 2023.

O lodo anaeróbico contém uma comunidade microbiana, que na ausência de oxigênio, digere a matéria orgânica do lodo cru, levando-o a condições de estabilidade, ou seja, reduzindo sua capacidade de agressão ao meio ambiente.

Os sólidos sedimentados formam o lodo primário destinado aos digestores e ao sistema de desidratação, antes da disposição final adequada. Nesta etapa ocorre, também, a formação de um sobrenadante, denominado de espuma, contendo alto teor de gorduras que é bombeado para o digestor.

No processo de centrifugação, o lodo digerido passa pelo processo de desidratação mecânica com o auxílio da adição de produtos químicos (polímeros de desidratação).

O lodo ou torta oriunda deste processo é então transportada para o aterro sanitário. O efluente resultante desta etapa (efluente primário) segue para a etapa de tratamento secundário.

iii. Tratamento Secundário (lodo ativado convencional): Nos tanques de aeração (câmara de aeração) o efluente dos decantadores primários e do digestor anaeróbico são misturados ao lodo ativado.

O lodo ativado é constituído, principalmente de bactérias e também de fungos e outros microrganismos, que na presença de oxigênio, se alimenta da matéria orgânica presente no esgoto.

Figura 25. Planta ETE Alegria, Caju.



Fonte: CEDAE.

Nos decantadores secundários ocorre a separação da mistura do lodo ativado e do esgoto tratado, denominado de efluente final.

Além da redução de poluentes orgânicos, o lodo ativado também desempenha função na redução de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, da água residual. Esses nutrientes são essenciais para o crescimento das bactérias no lodo, e sua redução é crucial para evitar a eutrofização dos corpos d'água receptores.

O efluente final, mais leve, verte para o canal de efluentes e o lodo ativado, mais pesado, é bombeado de volta aos tanques de aeração, para dar início a um novo ciclo.

O efluente final é lançado no canal do Fundão, que se comunica com a Baía de Guanabara.

A Baía de Guanabara é um importante corpo d'água localizado na cidade do Rio de Janeiro, com significativa importância ecológica, social e econômica para a região.

Figura 26. Vista esquemática da planta de operação ETE Alegria.



Fonte: CEDAE, 2019.

Foi celebrada parceria institucional entre este projeto de pesquisa e a Cedae, para a coleta de amostras de lodo de esgoto da Estação Alegria, Caju.

Figura 27. Reatores anaeróbios ETE Alegria, Caju.



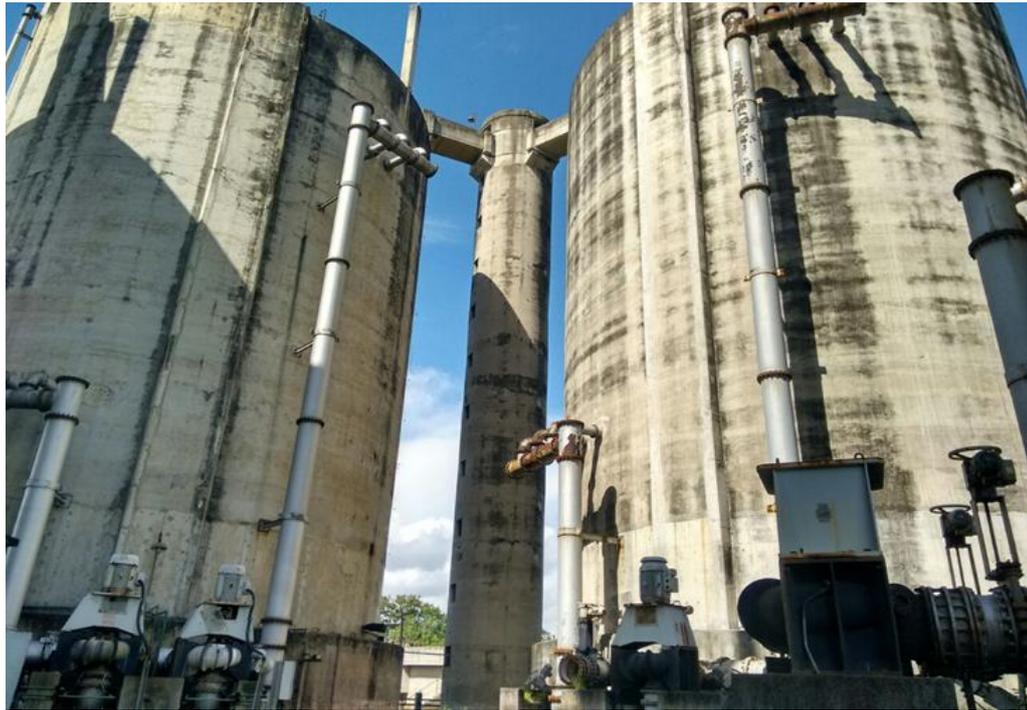
Fonte: a autora

2.3 Coleta das amostras

As amostras foram retiradas de um digestor anaeróbio em estado estacionário no momento da amostragem. Os reatores anaeróbios possuem capacidade $7400 \text{ m}^3/\text{dia}$ e TRH de 28 dias. Foram realizadas 9 campanhas de coleta de lodo de esgoto.

O lodo de esgoto foi coletado em bombonas plásticas com capacidade para 5L cada (marca Milkan) no primeiro ano de coleta e em garrafas de borosilicato (1L) com tampas rosqueadas no segundo ano de coleta (Figura 28). O lodo coletado foi imediatamente encaminhado ao laboratório, onde foi separado e propriamente acondicionado em função do experimento a ser realizado.

Figura 28. Coleta de lodo de esgoto anaeróbico na ETE Alegria, Cedae.



(a)



(b)



(c)

Legenda: (a) Ponto de coleta ETE Alegria, Cajú; (b) Bocal de saída do lodo anaeróbico (c) Amostra do lodo coletado.

Fonte: a autora.

2.4 Análises físico-químicas para a caracterização do lodo

A caracterização do lodo de esgoto foi realizada no LEC - laboratório de ensaios cinéticos da Unidade de Desenvolvimento Tecnológico (UDT) Gesar /Uerj.

Os parâmetros físico-químicos mensurados em triplicatas foram medidos de acordo com o Protocolo de Métodos Padrão Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Standard Methods Protocol (APHA 2017).

O pH inicial e final foi analisado com o medidor MS Tecnonon modelo Mpa210 e os níveis de temperatura foram registrados com um termômetro digital. As análises da demanda química de oxigênio (DQO) foram avaliadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800 UV-VIS) e a alcalinidade por titulação potenciométrica.

As séries completas de sólidos foram realizadas com método gravimétrico na escala analítica Gehaka AG200. As análises de carbono orgânico total (TOC) foram feitas usando o Analisador de Carbono Orgânico Total Shimadzu TOC 5000A.

Os equipamentos utilizados estão listados na Tabela 3. A Figura 29 mostra as análises físico-químicas realizadas no laboratório.

Tabela 3. Equipamentos utilizados para a caracterização do lodo de esgoto.

| Parâmetros | APHA (2017) |
|-----------------------------------|---|
| Série de sólidos | Método gravimétrico GEHAKA AG200 |
| Demanda Química de Oxigênio (DQO) | Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 UV-VIS |
| Carbono Orgânico Total (COT) | Analisador Shimadzu TOC 5000 ^a |
| Alcalinidade | Titulação potenciométrica |
| Temperatura | Termômetro digital Sensoterm |
| pH | MS Tecnonon Mpa210 meter |

Figura 29. Análises realizadas no laboratório Gesar/UERJ.



a



b



c



d



e

(a) Alcalinidade; (b) Lodo de esgoto nas garrafas digestoras; (c) Análise de sólidos; (d) Carbono Orgânico Total; (e) Demanda Química de Oxigênio.

2.5 Montagem dos experimentos BMP

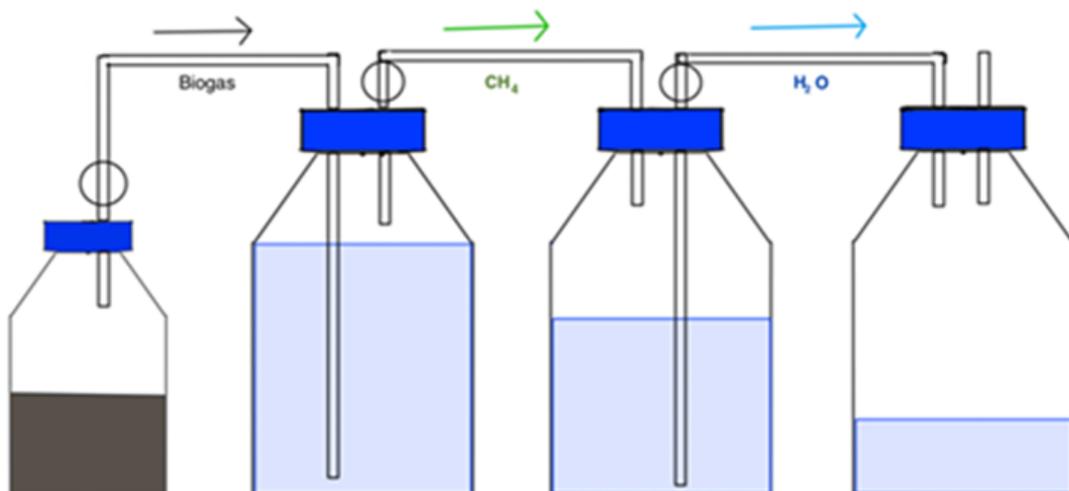
A montagem dos experimentos BMP foi realizada no laboratório de ensaios microbiológicos – LEM, UDT GESAR/UERJ. Os experimentos foram desenvolvidos para avaliar a produção metanogênica do lodo de esgoto anaeróbio da ETE Alegria. O valor do pH do lodo foi registrado no início e ao final do experimento para garantir a não ocorrência de inibição durante a atividade metanogênica.

O experimento foi conduzido em seis réplicas R1 - R6 ($n = 6$) incubadas durante 11 dias sob condições mesófilas ($37 \pm 0,1$ °C) utilizando banho-maria com frascos de digestão de 250 mL de volume total e 100 mL de volume de trabalho. O método de teste foi realizado de acordo com estudos anteriores de Angelidaki et al (2009) e a norma alemã VDI (2006) para avaliar a produção de CH_4 a partir de LE em escala laboratorial em estado estacionário (Figuras 31a e 31b).

Para evitar vazamento de gás dos digestores, tampas e conectores foram selados com graxa de alto vácuo. Para remover o oxigênio existente, gás nitrogênio foi liberado no *headspace* das garrafas por 2 min.

Cada experimento empregou 4 garrafas de borossilicato (Figura 30) usadas como recipientes de digestão exibindo resistência adequada ao calor e pressão.

Figura. 30. Diagrama esquemático do aparelho BMP usado no ensaio de BMP.



Fonte: a autora.

As garrafas foram vedadas com rolha de silicone na qual foram feitos dois furos. Na parte superior da tampa de silicone foram inseridas 2 válvulas torneiras de 3 vias e na parte inferior da tampa de silicone foram inseridos tubos de PVC maleável de 1 polegada para que a parte externa pudesse ser conectada ao sistema.

Na torneira de 3 vias, um tubo foi conectado a outra garrafa com uma solução alcalina (3 mol/L NaOH) que absorve todo o dióxido de carbono do gás de escape. O volume de gás produzido foi analisado até a finalização do teste quando a curva cumulativa de gás atingiu um platô.

Na garrafa digestora (primeira garrafa da sequência) as tubulações que saem da rolha de silicone não entram em contato com o lodo, ou seja, as tubulações ficam em contato apenas com os gases produzidos. Na sequência, o frasco com a solução de NaOH faz uma solução barreira para reter CO₂ e a cânula é submersa nesta solução básica. A outra válvula de 3 vias sai do segundo frasco com NaOH e se conecta a um terceiro frasco com solução salina. Neste frasco foi adicionado 1L de solução salina e uma rolha de silicone com duas torneiras de 3 vias. Em uma torneira, a garrafa é conectada à solução alcalina e, na outra torneira, ela é conectada à uma quarta garrafa que coleta o volume de solução salina deslocado.

A terceira garrafa contendo solução salina recebe o gás metano, filtrado pela segunda garrafa. A água na terceira garrafa é deslocada para a quarta e última garrafa, por conta do CH₄ entrando no sistema. O volume de água deslocado para a quarta garrafa representa o valor para a produção metanogênica em ml para determinado experimento.

Para evitar entupimentos nos tubos e válvulas, sugere-se que a distância entre as garrafas digestoras permita uma curvatura dos tubos, para melhor passagem do gás. A ordem de abertura das válvulas de três vias (primeiro o vaso digestor de fermentação, segundo o vaso contendo a solução de NaOH e finalmente o frasco contendo a solução salina saturada) deve ser seguida para que não haja refluxo e entupimento das válvulas.

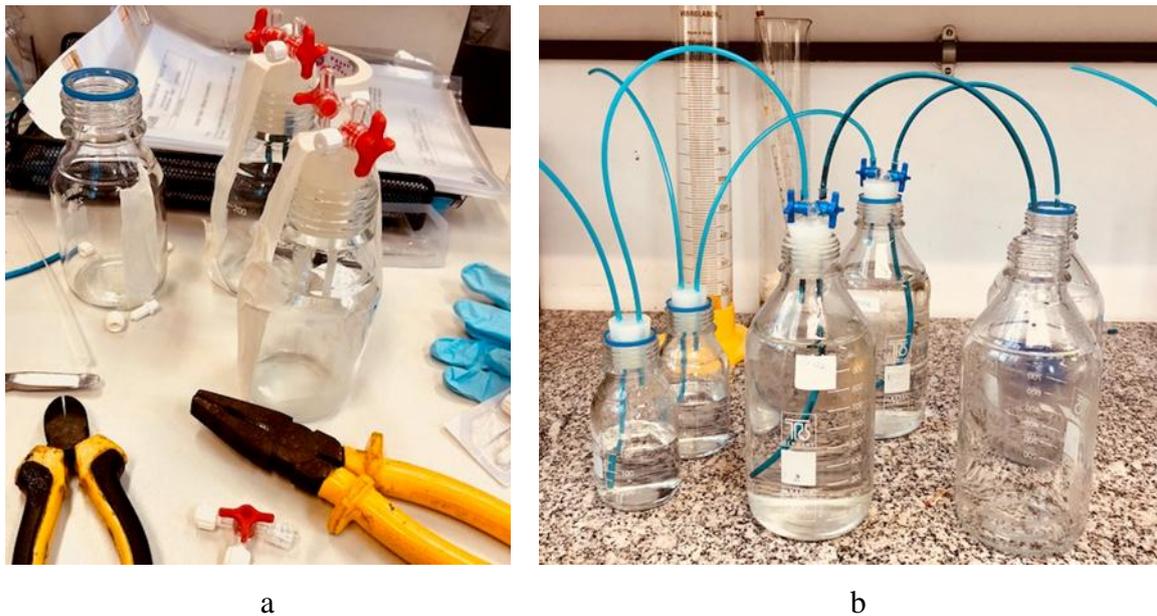
As vedações do sistema dos biodigestores foram verificadas com o auxílio de uma bomba de alta pressão, um transdutor de pressão piezoresistivo diferencial dual port MPX5050DP, um multímetro Fluke e um data logger Arduino, uma plataforma de prototipagem eletrônica de hardware livre e de placa única, cuja linguagem é C/C++ (Figuras 32, 33a e 33b).

Os parâmetros operacionais aplicados ao ensaio de BMP são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Ensaio de BMP: parâmetros operacionais.

| Operação | Unidade | BMP |
|-----------------|---------|----------------|
| Temperatura | °C | 37 ± 0.1 |
| Agitação | - | 2x dia |
| Volume total | mL | 250 |
| Volume trabalho | mL | 100 |
| Substrato | mL | Lodo de esgoto |
| Inóculo | mL | Lodo de esgoto |
| I/S ratio | v/v | 1:1 |

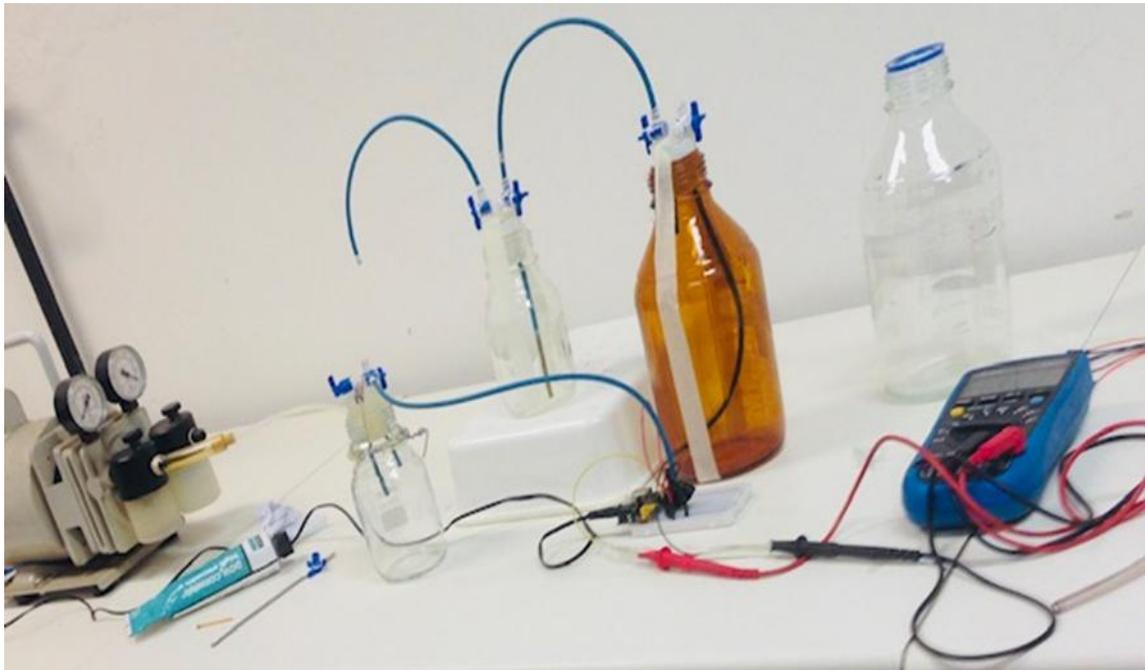
Figura 31. Montagem do experimento BMP.



(a) Inserção das válvulas de 3 vias nas rolhas de silicone para vedar as garrafas de borossilicato; (b) Montagem das garrafas de BMP com as mangueiras de 1 polegada.

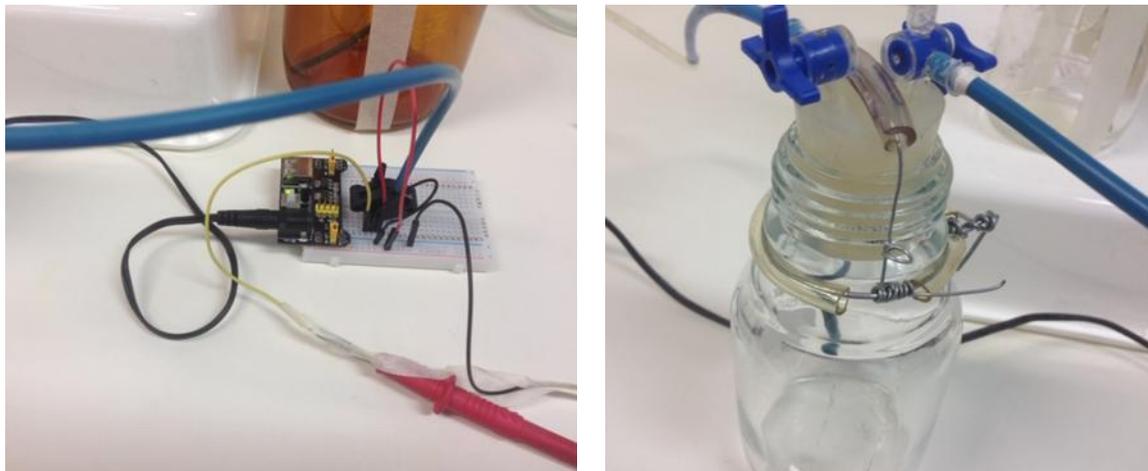
Fonte: a autora.

Figura 32. Checagem do estanqueamento do sistema com bomba peristáltica e sistema Arduino.



Fonte: a autora.

Figura. 33. Prototipagem eletrônica em sistema Arduino. Dispositivo mecânico para controle da pressão gerada no sistema digestor.



a

b

(a) Sistema Arduino; (b) dispositivo mecânico para controle da pressão.

Figura 34. Experimento BMP em operação no banho termostático.



(a)

(b)

(a) Experimento BMP em banho termostático; (b) válvulas e conectores no sistema BMP.

2.6 Modelo computacional ADM1

O Modelo de Digestão Anaeróbia 1 (ADM1) é o padrão da indústria para modelar os processos de DA que resultam na produção de CH_4 a partir de águas residuais. Foi desenvolvido pela *International Water Association* (IWA) e é baseado em vários modelos AD mais simples. Considera um reator continuamente agitado contendo águas residuais e 12 grupos bacterianos diferentes que consomem/produzem 12 substratos diferentes. Este cenário é descrito por um sistema de 24 Equações Diferenciais Ordinárias (EDOs).

O modelo também considera reações físico-químicas dentro do próprio substrato, aumentando o número de substratos para 23 e aumentando o número total de variáveis de estado para 35. Essas reações físico-químicas são classificadas em duas categorias: reações ácido-base e troca líquido-gasosa, ambas podendo ser modeladas por EDOs, resultando no sistema total descrito por 35 EDOs.

Neste trabalho, é empregado o Benchmark Simulation Model 2 (BSM2), (Alex et al., 2019), que é uma versão modificada do modelo IWA ADM1 (BATSTONE, 2002). O modelo compreende dois estágios extracelulares, nomeadamente desintegração e hidrólise, e três estágios intracelulares: acidogênese ou fermentação, acetogênese e metanogênese.

Os estágios extracelulares foram modelados usando cinética de primeira ordem. Neste trabalho foi utilizado, indistintamente, a notação de nomenclatura de variáveis e parâmetros do modelo empregada por Alex et al. (2019), Batstone (2002) e Allen (2023). Por exemplo, a concentração de compostos complexos particulados é representada de forma intercambiável por X_c ou $X_{_c}$.

Inicialmente, X_c foi desintegrado em X_{ch} , X_{pr} , and X_{li} , assim como X_i e S_i , utilizando um coeficiente de desintegração (k_{dis}). A cinética do tipo Monod foi usada para descrever a captação de substrato nas reações bioquímicas intracelulares. Neste estudo, dois simuladores acoplados sequencialmente baseados no modelo ADM1 foram empregados para o processo AR e o ensaio BMP para fornecer uma avaliação mais abrangente da entrada de lodo de esgoto, que será explicada na seção seguinte.

Neste estudo, utilizamos uma nova implementação de ADM1 baseada em EDA (Equação Algébrica Diferencial), desenvolvida na linguagem de programação Julia. Esta implementação guarda semelhanças com um trabalho recente de Allen et al. (2023). Nossa implementação, entretanto, adota a abordagem DAE, em vez da abordagem EDO empregada por Allen et al. Nossa escolha desta abordagem foi motivada por sua excepcional eficiência computacional, superando a de implementações alternativas baseadas em DAE em Java e Python. Como resultado, permite-nos realizar análises de otimização complexas sem incorrer em despesas computacionais indevidas.

Os valores dos parâmetros do modelo estequiométrico, bioquímico e físico-químico foram aqueles apresentados em Rosen e Jeppsson (2005), conforme mostrado na Tabela 6, e não foram modificados para representar a situação em estudo.

Tabela 6. Valores dos parâmetros estequiométricos, bioquímicos e físico-químicos do modelo ADM1 utilizados nas simulações.

| Parâmetro | Valor | Unidade | Parâmetro | Valor | Unidade | Parâmetro | Valor | Unidade |
|-----------|-------------|--------------------|-----------|--------|-----------------------|-----------------|----------|---------|
| R | 0.083145 | bar / M K) | f_ac_aa | 0.4 | – | pH_UL_h2 | 6 | |
| T_base | 298.15 | K | C_va | 0.024 | kmole C /Kg COD | pH_LL_h2 | 5 | – |
| P_atm | 1.013 | bar | Y_aa | 0.08 | | k_dec_X_su | 0.02 | |
| T_op | 308.15 | K | Y_fa | 0.06 | | k_dec_X_aa | 0.02 | |
| f_sI_xc | 0.1 | | Y_c4 | 0.06 | | k_dec_X_fa | 0.02 | |
| f_xI_xc | 0.2 | | Y_pro | 0.04 | | k_dec_X_c4 | 0.02 | 1/d |
| f_ch_xc | 0.2 | – | C_ch4 | 0.0156 | kmole C /Kg COD | k_dec_X_pr o | 0.02 | |
| f_pr_xc | 0.2 | | Y_ac | 0.05 | – | k_dec_X_ac | 0.02 | |
| f_li_xc | 0.3 | | Y_h2 | 0.06 | – | k_dec_X_h2 | 0.02 | |
| N_xc | 0.002685714 | | k_dis | 0.5 | | T_ad | 308.15 | K |
| N_I | 0.004286 | kmole N /Kg COD | k_hyd_ch | 10 | 1/d | K_h2o | 2.08E-14 | |
| N_aa | 0.007 | | k_hyd_pr | 10 | | K_a_va | 1.38E-05 | |
| C_xc | 0.02786 | | k_hyd_li | 10 | | K_a_bu | 1.51E-05 | M |
| C_sI | 0.03 | kmole C /Kg COD | K_S_IN | 0.0001 | M | K_a_pro | 1.32E-05 | |
| C_ch | 0.0313 | | k_m_su | 30 | 1/d | K_a_ac | 1.74E-05 | |
| C_pr | 0.03 | | K_S_su | 0.5 | Kg COD/m ³ | K_a_co2 | 4.94E-07 | |

| | | | | | | | | |
|----------|-------------|-----------------|------------|--------------------------|-----------------------|-----------|--------------------|-----------------------|
| C_li | 0.022 | | pH_UL_aa | 5.5 | | K_a_IN | 1.11E-09 | |
| C_xI | 0.03 | | pH_LL_aa | 4 | | k_AB_va | 1.00E+10 | |
| C_su | 0.0313 | | k_m_aa | 50 | 1/d | k_AB_bu | 1.00E+10 | |
| C_aa | 0.03 | | K_S_aa | 0.3 | Kg COD/m ³ | k_AB_pro | 1.00E+10 | |
| f_fa_li | 0.95 | | k_m_fa | 6 | 1/d | k_AB_ac | 1.00E+10 | 1/M d |
| C_fa | 0.0217 | kmole C /Kg COD | K_S_fa | 0.4 | Kg COD/m ³ | k_AB_co2 | 1.00E+10 | |
| f_h2_su | 0.19 | | K_I_h2_fa | * 5.00E-04 (5.00E-06) | | k_AB_IN | 1.00E+10 | |
| f_bu_su | 0.13 | | k_m_c4 | 20 | 1/d | p_gas_h2o | 0.055667745 | bar |
| f_pro_su | 0.27 | | K_S_c4 | 0.2 | Kg COD/m ³ | k_p | 50000 | m ³ /d bar |
| f_ac_su | 0.41 | | K_I_h2_c4 | 1.00E-05 | | k_L_a | 200 | 1/d |
| N_bac | 0.005714286 | kmole N /Kg COD | k_m_pro | 13 | 1/d | K_H_co2 | 0.027146693 | |
| C_bu | 0.025 | | K_S_pro | 0.1 | Kg COD/m ³ | K_H_ch4 | 0.001161903 | M/bar |
| C_pro | 0.0268 | kmole C /Kg COD | K_I_h2_pro | 3.50E-06 | | K_H_h2 | 0.000738465 | |
| C_ac | 0.0313 | | k_m_ac | 8 | 1/d | V_liq | * 3485.4 (3400) | m ³ |
| C_bac | 0.0313 | | K_S_ac | 0.15 | Kg COD/m ³ | V_gas | 300 | |
| Y_su | 0.1 | | K_I_nh3 | 0.0018 | M | Q_ad | * e246.67 (170) | m ³ /d |
| f_h2_aa | 0.06 | | pH_UL_ac | 7 | | tresX | 40 | d |
| f_va_aa | 0.23 | | pH_LL_ac | * 5.9 (6) | | k_dec_all | 0.02 | 1/d |
| f_bu_aa | 0.26 | | k_m_h2 | 35 | 1/d | | | |
| f_pro_aa | 0.05 | | K_S_h2 | 7.00E-06 | Kg COD/m ³ | | | |

2.6.1 Módulo de simulação do sistema Reator Anaeróbio (RA)

A primeira aplicação do ADM1 foi empregada para simular o tratamento do lodo influente no RA, que é um processo contínuo. O fluxo de entrada do LE é uma mistura particulada complexa, caracterizada pela massa de DQO (X_c). Os constituintes primários de X_c foram considerados compostos orgânicos (X_{ch} , X_{pr} , and X_{li}) e compostos inorgânicos (X_i e material inerte solúvel (S_i)).

A unidade (kg COD m^{-3}) foi utilizada para inserir X_c e outros substratos orgânicos no modelo. Subsequentemente, X_c foi decomposto em cinco componentes distintos, de acordo com suas proporções correspondentes, conforme determinado pelo rendimento do produto ao substrato ($f_{\text{product_substrate}}$), o que levou à hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. As variáveis de estado de entrada das frações solúveis (S_s) no módulo RA ADM1 foram definidos com base em um procedimento de melhor ajuste, conforme explicado abaixo.

descontínuo - o ensaio BMP. A saída do primeiro módulo serve como entrada para o segundo módulo. Os parâmetros de entrada do primeiro módulo são obtidos através de um solucionador de otimização iterativo. O solucionador minimiza a discrepância entre os valores simulados e medidos para a curva de produção de CH₄ em momentos selecionados e a DQO no início do ensaio de BMP.

A metodologia empregada para determinação dos parâmetros do modelo segue uma abordagem de otimização de mínimos quadrados, elaborada a seguir.

O objetivo principal da otimização de mínimos quadrados é identificar os parâmetros do modelo que se alinham de forma mais eficaz com o conjunto de dados experimentais. Este conjunto de dados compreende 'n' pontos de dados representados como pares (x_i, y_i) , $i = 1, \dots, n$, onde x_i significa um parâmetro ADM1 independente e y_i corresponde a um parâmetro dependente derivado dos ensaios de BMP. A função do modelo é denotada como $f(x_i, \Pi)$, com m parâmetros ajustáveis incluídos no vetor de parâmetros Π . O objetivo final é determinar os valores dos parâmetros do modelo que oferecem o ajuste mais próximo dos dados. A qualidade de ajuste de um modelo a um determinado ponto de dados é quantificada pelo residual r_i , o que significa a disparidade entre o valor observado da variável dependente e o valor previsto pelo modelo:

$$r_i = y_i - f(x_i, \Pi) \quad (\text{Equação 8})$$

Parâmetros Π foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ponderados, para encontrar os valores ótimos minimizando a soma dos resíduos quadrados /quadrados residuais, S:

$$S = \sum_{i=1}^n \frac{r_i^2}{\sigma_{m,i}} \quad (\text{Equação 9})$$

onde $y_{m,i}$ é o i-ésimo valor medido da medição alvo, assumido como uma variável aleatória normalmente distribuída; $f(x_i, \Pi)$ é a previsão do modelo no momento correspondente ao ponto de dados i, que pode ser considerada uma função do conjunto de parâmetros Π a ser estimada; $\sigma_{m,i}$ é o erro padrão da medição $y_{m,i}$ e pondera cada termo da soma.

O erro padrão foi estimado a partir dos valores medidos, utilizando a expressão:

$$\sigma_{m,i} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 10})$$

onde σ é o desvio padrão, e n é o número de amostras. No caso do modelo combinado RA-BMP ADM1, a medição alvo é a produção acumulada de metano ao longo dos testes de BMP. O erro padrão de cada medida foi estimado utilizando o desvio padrão dos resultados do BMP.

Inúmeras bibliotecas de otimização estão prontamente acessíveis na plataforma Julia, facilitando a prototipagem rápida e a experimentação com diversas estratégias para enfrentar os desafios de otimização de implementação. Diversas alternativas foram testadas, com destaque para Optimization.jl. Esta biblioteca tem como objetivo amalgamar uma série de pacotes de otimização, tanto locais quanto globais, em uma interface Julia coesa. Optimization.jl apresenta atributos de alto nível, como integração perfeita com diferenciação automática, tornando sua utilização simples para a maioria dos cenários, ao mesmo tempo que mantém todas as opções em uma interface unificada.

Embora uma abordagem simples baseada em gradiente possa ser suficiente em certos casos, podem surgir complicações devido a variáveis positivas. Os métodos baseados em gradiente apresentam muitas deficiências, como convergência lenta, dificuldade com problemas descontínuos, mínimos locais e pontos de sela. Consequentemente, uma extensa gama de métodos disponíveis na biblioteca Optimization.jl foi avaliada neste trabalho, revelando em última análise o método DE/rand/1/bin method como o mais adequado.

O método de otimização "DE/rand/1/bin" é uma variante específica do algoritmo de Evolução Diferencial (ED), uma técnica versátil para resolver desafios de otimização em vários domínios.

A DE/rand/1/bin implementada na biblioteca Optimization.jl da linguagem Julia foi, portanto, utilizada como técnica de minimização, com tolerância de convergência de $4E-3$ na função objetivo. O processo de estimativa é repetido usando diferentes estimativas iniciais de parâmetros para verificar a convergência do algoritmo para os mesmos valores ótimos.

O modelo combinado RA-BMP emprega, como dados de entrada, os valores de DQO do lodo da estação de tratamento de esgotos (ETE) e a produção de CH_4 do ensaio BMP. O método de otimização iterativo é empregado para encontrar a condição inicial do lodo da ETE (X_{ch} , X_{pr} , and X_{li}), bem como o tempo de retenção hidráulica efetivo (TRH) do RA, que são parâmetros de entrada do modelo RA ADM1.

O método de busca é iterado até que as condições iniciais do módulo BMP ADM1, obtidas do módulo RA, resultem em uma curva de produção simulada de CH_4 que melhor corresponda aos valores nos pontos da curva metanogênica obtidos no ensaio BMP.

Em suma, modelo acoplado AR-BMP produz uma curva metanogênica de BMP simulada que melhor se ajusta aos valores da curva metanogênica obtida nos ensaios experimentais de BMP, no sentido dos mínimos quadrados.

O modelo foi calibrado usando os dados experimentais para simular com precisão o processo de DA. A saída do primeiro modelo resulta em lodo com valores de DQO semelhantes ao lodo do biodigestor da ETE. Além disso, produz uma descrição mais completa do LE de saída do RA que é consistente com os dados de entrada.

2.7 Caracterização da comunidade microbiana

Foram congeladas amostras de todos os experimentos BMP realizados no laboratório Gesar/Uerj, em tubos Falcon (20 e 50 mL), para análise molecular (Figuras 36a e 36b).

Figura 36. Amostras de lodo de esgoto congeladas em tubos Falcon



(a)



(b)

Fonte: a autora

2.7.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído das amostras usando o PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (Figuras 37, 38 e 39).

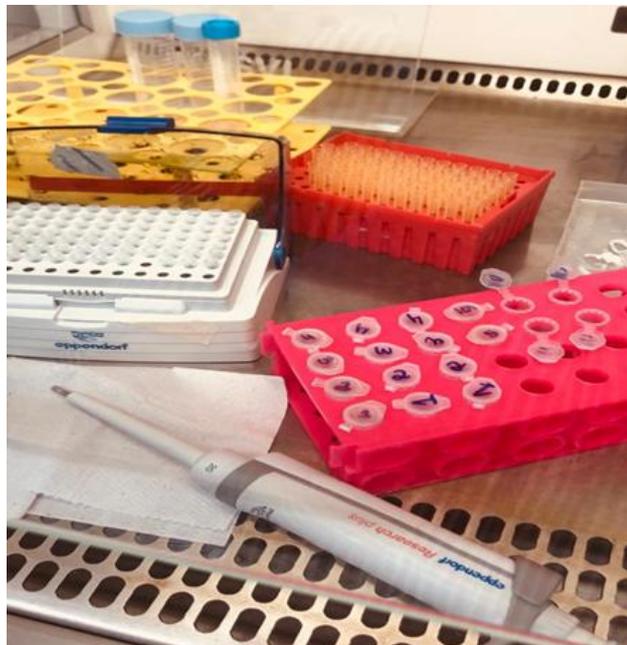
O DNA foi quantificado com um espectrofotômetro nanodrop, e seu rendimento e pureza foram documentados (caracterizado pela razão de absorção de 260/280 nm).

Figura 37. Amostra do lodo de esgoto coletado na ETE – Alegria, RJ.



Fonte: a autora.

Figura 38. Extração de amostras de DNA no Laboratório LABIFI/UERJ.



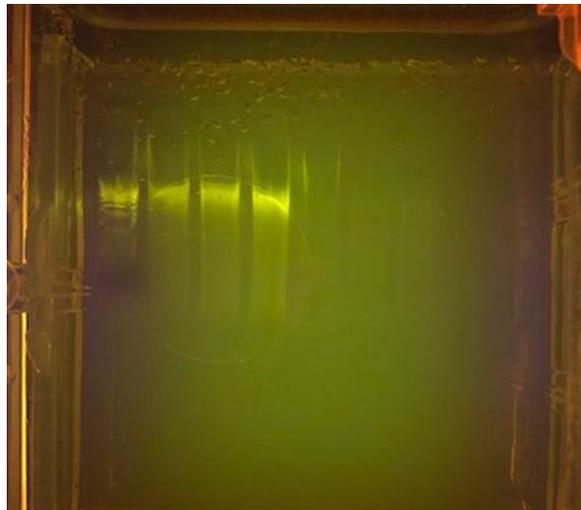
Fonte: a autora.

Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 5µL da amostra foi submetida a uma eletroforese a 80 Volts em gel de agarose (0,8%) por duas horas. O gel foi corado por aproximadamente 15 minutos em solução de brometo de etídeo (2 µg/mL) e observado em um transiluminador com luz ultravioleta.

O sequenciamento do gene amplicon 16S rRNA foi realizado com Microsynth (Suíça) em um sequenciador MiSeq Illumina, usando uma abordagem bp paired end e os primers 515F (GTG CCA GCM GCC GCG GTA A) e 806R (GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT) visando a região V4 bacteriana do rRNA 16S (Caporaso et al., 2011).

As comunidades microbianas em ambas as fases (no início e no final dos 11 dias de DA) no ensaio de BMP foram caracterizadas usando o gene marcador 16S rRNA. Repetições de amostragem foram realizadas em ambas as etapas do experimento e os resultados foram comparados para avaliar a adaptação e a especialização dos consórcios microbianos durante a DA.

Figura 39. Gel de agarose para verificação da integridade do DNA extraído mostrando bandas claras e fortes.



Fonte: a autora.

2.7.2 Preparo de biblioteca e análise de sequenciamento

As bibliotecas foram preparadas seguindo as recomendações da Illumina. Os primers foram usados para amplificação específica de locus de bactérias flanqueando a região específica de locus. A sequência *overhang* de adaptadores está incluída em primers específicos de locus.

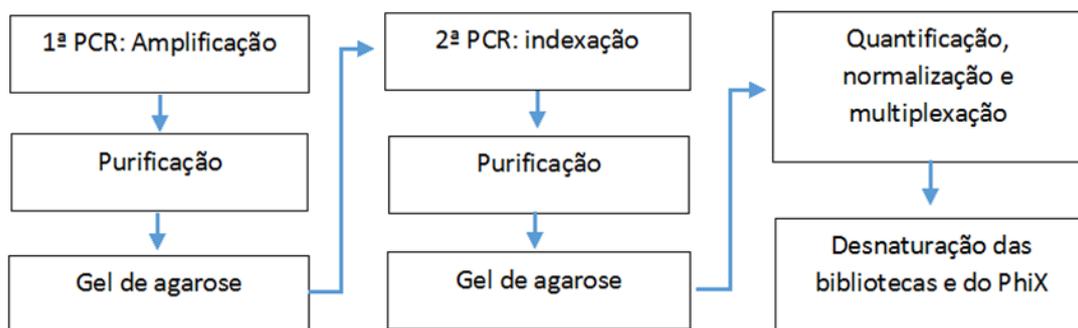
As sequências de adaptadores Illumina, que foram hibridizadas com as sequências imobilizadas na lâmina de sequenciamento são:

- (i) sequência à frente: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-
- (ii) sequência reversa: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-

O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina Miseq (Figura 40), e as leituras produzidas foram de 2x250 pb.

A primeira PCR foi realizada para amplificação locus-específica. Em seguida, AMPure XP beads foram utilizadas para purificação da reação de PCR, e o tamanho dos fragmentos gerados na reação de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose. A segunda PCR foi realizada para ligar os barcodes do kit Nextera XT, e novas etapas de purificação da PCR e validação das bibliotecas foram realizadas. Posteriormente, as bibliotecas foram quantificadas, para que todas as amostras/bibliotecas fossem unidas de maneira equimolar em um único pool.

Figura 40. Sequenciamento no sistema Illumina Miseq



Fonte: NGS Soluções Genômicas, 2023.

Para introduzir complexidade de sequenciamento, um controle heterogêneo, o fago *phi-X*, foi combinado com o pool de amplicons.

A desnaturação das bibliotecas e do *phi-X* foi realizada para permitir o sequenciamento.

2.7.3 Análise de dados

Leituras multiplexadas foram atribuídas em amostras biológicas. O programa DADA2 (Callahan et al., 2016), um pacote de código aberto implementado na linguagem R, foi utilizado

para modelar e corrigir erros de amplicons. O pacote DADA2 possui um pipeline completo implementado para transformar os arquivos fastq do sequenciador em sequências de amostra inferidas, desmembradas e sem quimeras. A filtragem de arquivos fastq foi realizada para cortar as sequências de primers de PCR e filtrar as extremidades 3' das leituras devido ao decaimento de qualidade ($Q < 30$).

Após a filtragem, as reads ficaram com tamanho de 2 x 250 pb, mantendo a sobreposição para posterior junção das leituras e remontagem do fragmento. O algoritmo DADA2 faz uso de um modelo de erro paramétrico e cada conjunto de dados de amplicon tem um conjunto diferente de taxas de erro.

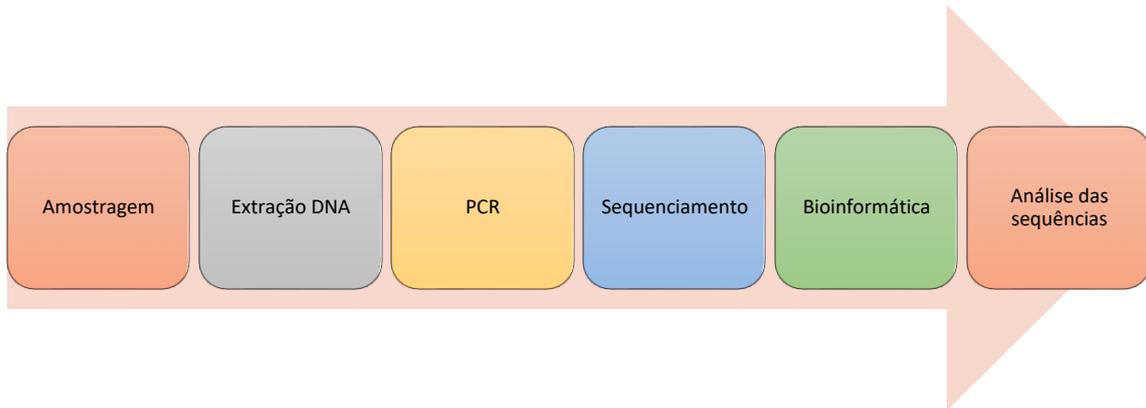
O método learnErrors aprende esse modelo de erro a partir dos dados, alternando entre estimar as taxas de erro e inferir a composição da amostra de modo a convergir para uma solução consistente. Como em muitos problemas de aprendizado de máquina, o algoritmo deve começar com uma suposição inicial, para a qual são usadas as taxas de erro máximas possíveis nesses dados (as taxas de erro se apenas a sequência mais abundante estiver correta e todo o resto for erros).

Para maior precisão, o erro é estimado com amostras de componentes de toda a execução de sequenciamento. Em seguida, a etapa de desreplicação (denoising) é realizada para obter uma lista detalhada de sequências únicas e suas abundâncias e produzir pontuações de qualidade de posição de consenso para cada sequência única, calculando a média das qualidades posicionais das leituras de componentes.

Após o processamento inicial dos dados de sequenciamento pelo DADA2, taxonomias foram atribuídas a cada ASV (*Amplicon Sequencing Variants*) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método classificador bayesiano ingênuo para esse fim. A função assignTaxonomy toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida e atribui taxonomias. A base de dados Silva 138 foi utilizada como referência.

As classificações taxonômicas e suas quantificações geradas por DADA2 foram importadas para o programa Phyloseq (McMurdie et al., 2017) e também implementadas em R. O pacote phyloseq é uma ferramenta para importar, armazenar, analisar e exibir graficamente dados complexos de sequenciamento filogenético que já foram agrupados em ASVs. Este pacote aproveita muitas das ferramentas disponíveis em R para ecologia e análise filogenética (vegan, ade4, ape, picante), enquanto também usa sistemas gráficos avançados / flexíveis (ggplot2) para produzir facilmente gráficos de alta qualidade. A Figura 41 mostra as etapas no presente estudo para pesquisa da diversidade microbiana nos reatores.

Figura 41. Sequência de etapas realizadas para estudar a diversidade microbiana nos reatores.



Fonte: a autora.

As análises de diversidade Alpha e Beta, foram realizadas no pacote phyloseq. Foram filtradas as ASVs que não foram classificadas em pelo menos até o nível de família, e ASVs assinaladas como o mesmo gênero foram aglomeradas.

2.7.4 Sequenciamento 16S

O DNA total (10 µg) foi submetido ao sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando a plataforma Illumina. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa QIIME (CAPORASO et al., 2010) para classificação das sequências em unidade taxonômicas operacionais (OTU), seguido de classificação filogenética de cada OTU, através de banco de dados GenBank e/ou RDP. A comparação das bibliotecas construídas das diferentes amostras será realizada através dos softwares QIIME (Caporaso et al., 2010). Análises de comparação da composição de grupos filogenéticos presente nas diferentes amostras foram realizadas utilizando o pacote UniFrac (CAPORASO et al., 2010).

2.7.5 Amplificação por qPCR de genes associados à arqueias metanogênicas em experimentos de co-digestão

Para extração de DNA 500 mg do lodo centrifugado foi processado usando o kit DNeasy Power Soil Pro (Qiagen, EUA), seguindo as orientações dos fabricantes. A qualidade e a concentração do DNA foram verificadas com o NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e o fluorômetro Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, EUA), respectivamente. Para a

amplificação dos genes foram realizadas reações de PCR em um volume final de 25 µl em tubo contendo tampão de PCR 5X da Promega® na concentração de 1X, 5 mM MgCl₂, 2 mM de dNTP, 0,2 µM cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 1 µl (50 a 100 ng) de DNA e água MilliQ estéril q.s.p. 50 µl.

Os genes 16S rRNA e mcrA foram quantificadas através de PCR quantitativa (qPCR). Para o 16SrRNA, o par de iniciadores foi 341f/534r (BARLAAN et al 2005; MUYZER et al., 1993). Para o gene mcrA, o par de primers usado foi qmcrAf/qmcrAr (DENMAN et al., 2007; ANANTASOOK et al., 2013). Para a construção das curvas de referência, os genes foram amplificados com os pares de primers mencionados anteriormente em amostras ambientais, ligados em plasmídeos (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific, EUA) e transformados em plasmídeo E. coli DH5alpha com método de choque térmico (Froger and Haul, 2007).

Culturas de 10 mL de células transformadas foram cultivadas durante a noite e os plasmídeos foram extraídos com o sistema PureYield Plasmid Miniprep (Promega, EUA). A partir da quantificação dos plasmídeos, diluições seriadas de dez vezes variando de 50 a 5 x 10⁸ cópias de genes por reação foram geradas.

Os ensaios de PCR quantitativos foram realizados em um sistema QuantStudio-3 Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA). Cada reação tinha 12 µL de volume e continha: 1 µL de DNA, 6 µL de GoTaq qPCR Master Mix (2x; Promega, EUA), 0,96 µL (0,8 µM) de cada primer e 3,08 µL de água livre de nuclease.

As reações foram realizadas em triplicatas em MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, EUA), juntamente com um controle negativo e 8 diluições seriadas dos padrões de plasmídeo. O protocolo utilizado foi: 95 °C por 20 s; 40 ciclos de 95 °C por 3 s, temperatura de recozimento (58 °C para mcrA e 53 °C para 16S) por 20 s e 72 °C por 45 s; 95 °C por 1 s, 60 °C por 20 s e 95 °C por 1 s (curva de fusão). A fluorescência de SybrGreen foi lida durante a etapa de extensão de cada ciclo.

Com base na curva padrão, quantificações absolutas foram realizadas para cada amostra e os números de cópias foram normalizados para um grama de lodo anaeróbio fresco. Para normalizar para um grama de lodo anaeróbio seco, parte das amostras utilizadas para extração de DNA foram colocadas em tubos estéreis de 1,5 ml, pesadas e secas durante a noite em estufa a 60° C e pesadas novamente para medir a perda de água. As eficiências das reações foram calculadas como: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Os dados foram testados para homocedasticidade com o teste de Levene e submetidos a ANOVA para testar diferenças estatísticas.

2.8 Meta-análise da co-digestão do lodo de esgoto

Foi realizada uma revisão sistemática seguindo as diretrizes Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA), com artigos publicados entre 2012 e 2022, utilizando as palavras-chave "anaerobic co-digestion" AND "methane yield" AND "BMP" AND "WWTP" AND "sewage sludge". A busca limitou-se a artigos como tipo de documento e idioma inglês (Figura 42).

Os critérios de elegibilidade para a inclusão de artigos na revisão foram: a) Seleção de títulos/resumos relevantes; b) Menção da produção do rendimento de metano; c) Codigestão do lodo de esgoto de ETE e outros substratos e, d) Experimentos conduzidos em potencial bioquímico de metano. Os dados coletados dos artigos foram agrupados em planilha Excel.

Figura 42. Diagrama de fluxo de itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises (PRISMA)



2.8.1 Co-digestão de LE e sardinha

O processo de co-digestão de LE com sardinha foi avaliado em ensaios BMP como descrito anteriormente. Este estudo foi realizado para investigar o efeito do uso de sardinha (SA) como substrato para CoDA de LE de uma ETE com foco em aumentar a produção do rendimento de CH₄. O objetivo deste experimento foi determinar a relação LE/SA correspondente à melhor atividade metanogênica em culturas descontínuas e análise da comunidade microbiana através de qPCR.

Os experimentos de teste BMP foram realizados com LE e SA misturados em proporções predefinidas 1:0, 1:1, 2:1, 3:1 (razão VS) e inseridos em um biodigestor com volume total (Vto) 250 mL e 120 mL Vtr (volume de trabalho de 50% e 50% de espaço livre - headspace).

Dentre as amostras estudadas, LE representa lodo de esgoto 100% como controle, e a proporção de mistura de LE e SA para SA-LE1, SA-LE2 e SA-LE3 foi de 1:1, 2:1 e 3:1, respectivamente, no intuito de verificar as condições ideais para aumentar a produção do CH₄. Condições experimentais detalhadas e razões de mistura estão resumidas na Tabela 7.

Tabela 7. Desenho experimental dos testes de bancada

| Experimento | SA: LE VS | SA volume mL | LE volume mL |
|-------------|--------------|-----------------|-----------------|
| LE | 0: 1 | 0 | 120 |
| SA-LE1 | 1: 3 | 30 | 90 |
| SA-LE2 | 1: 1 | 60 | 60 |
| SA-LE3 | 3: 1 | 90 | 30 |

Legenda: SA sardinha, LE lodo de esgoto

A construção e calibração do BMP foi desenvolvida seguindo as diretrizes propostas pela VDI 4630 (2006), Angelidaki et al., 2009 e por estudos anteriores realizados por este grupo de pesquisa (Rocha et al, 2024). Todos os lotes foram realizados em triplicatas. Os ensaios foram conduzidos até que a produção diária de biogás de cada frasco fosse 1% ou menor do que a produção acumulada. A duração do experimento foi de 21 dias para coDA e 12 dias para monodigestão de LE. O experimento foi mantido em banho-maria (Deluq, DL 552) com temperatura mesofílica controlada a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O protocolo para MEV foi realizado na Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón-Lins (Unimicro) do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, UFRJ. Considerada uma técnica poderosa e de alta resolução amplamente utilizada para estudar a morfologia e a estrutura de MO, incluindo metanogênicos em amostras ambientais complexas, como no caso de LE.

A amostra de LE foi coletada de maneira representativa e preservada adequadamente (-20°C) para manter a integridade das estruturas biológicas. As lâminas de vidro foram tratadas

com Poli-L-lisina por 5 minutos. A fixação foi realizada com glutaraldeído a 2.5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 1 h, para manter a estrutura celular. Seguido por lavagem em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M (3x), pós-fixação em 2% OsO₄ com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (1:1), durante 1 h.

Posteriormente, a amostra foi desidratada por meio de banhos em etanol: 30, 50, 70, 90 e 100% de concentração (15 minutos cada e 3x na última concentração). Várias trocas são necessárias para assegurar a remoção completa da água sem causar danos às estruturas celulares.

Após a desidratação, a amostra foi submetida a secagem a 221 bar e 374 °C no aparelho de ponto crítico, utilizando CO₂ para a remoção completa de qualquer vestígio de solvente.

Para melhorar a condutividade elétrica e otimizar a resolução da imagem, a amostra foi metalizada com uma fina camada de ouro, sendo então depositada em suporte metálico para facilitar a observação no MEV. A metalização com fina camada de ouro melhora a condutividade elétrica da superfície, permitindo dispersão eficaz do feixe de elétrons e evitando a acumulação de carga.

A amostra preparada foi introduzida no MEV, onde o feixe de elétrons é focalizado na superfície da amostra, e elétrons secundários são detectados para criar uma imagem tridimensional de alta resolução da superfície da amostra.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros físico-químicos do lodo ETE-Alegria

Na Tabela 8 são apresentados os parâmetros físico-químicos (pH, Alcalinidade, Série de Sólidos, Demanda Química de Oxigênio - DQO e Carbono Orgânico Total - COT) para o lodo de esgoto da ETE-Alegria coletados ao longo de dois anos (incluindo períodos secos e chuvosos).

A variação do pH nesse período não foi significativa, mantendo-se na faixa 6.7 ± 0.3 a 7.4 ± 0.1 com média 7.15 ± 0.26 . Os sólidos totais apresentaram valores de 1% a 3% para período seco (julho a novembro) e 1 a 4% para o período chuvoso (dezembro a março), sendo o valor médio ao longo desses dois anos de 2.16%. A alcalinidade variou de 2185 ± 146 mgCaCO₃/L (mínima) a 2564 ± 113 mgCaCO₃/L (máxima), com média de 2379 ± 120 mg CaCO₃/L estando sempre dentro da faixa recomenda de 1500 a 5000 (METCALF, 2013). A DQO mínima foi 21819 ± 312 mg/L⁻¹ e a máxima de 24309 ± 310 mg/L⁻¹, sendo a média ao longo de dois anos de coleta (23054 ± 1060 mg/L⁻¹). O carbono orgânico total no primeiro ano de coleta de lodo de esgoto não foi analisado. As análises realizadas no segundo ano demonstraram variação de 880 ± 58 a 970 ± 52 mg/L, sendo a média (915 ± 48 mg/L).

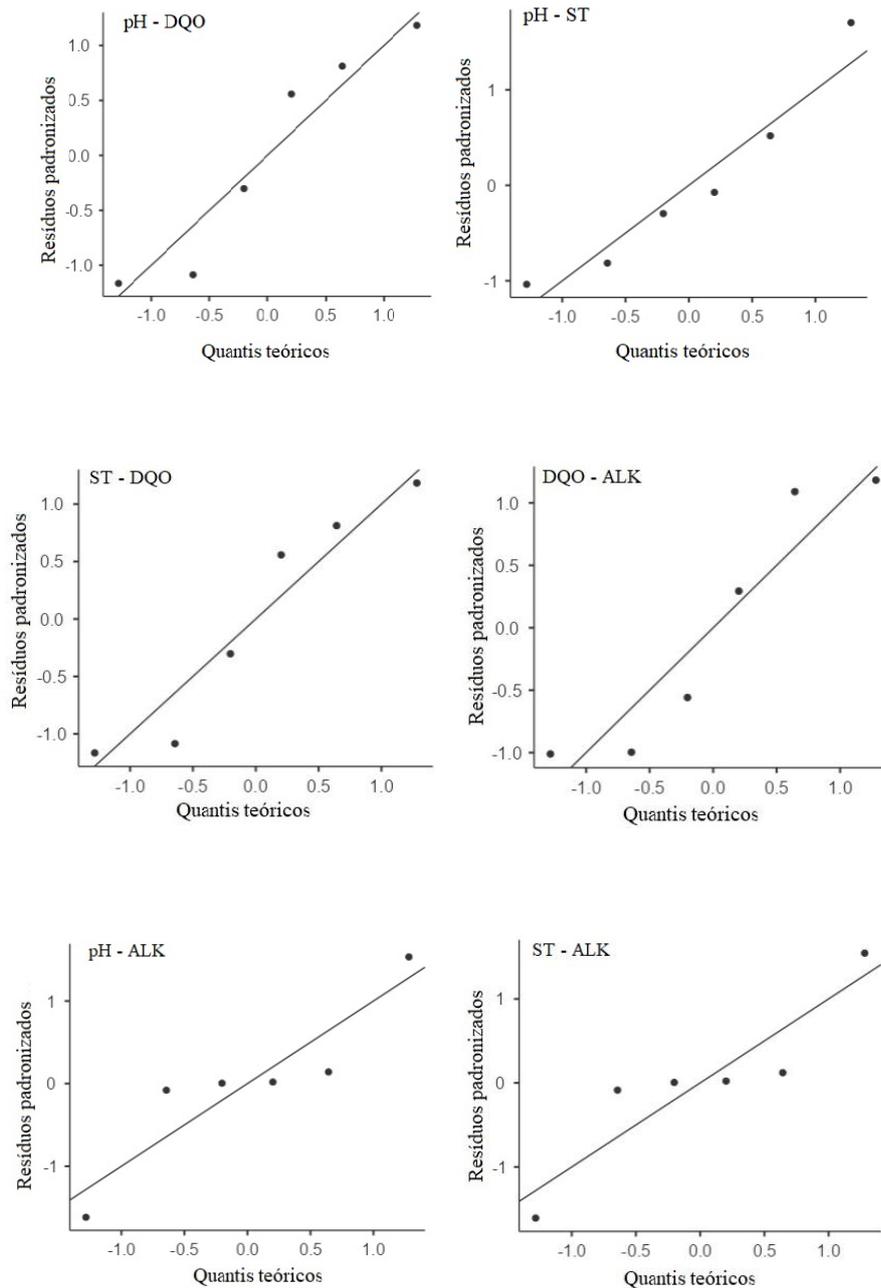
A sazonalidade não evidenciou mudanças significativas nos parâmetros físico-químicos mensurados para o lodo de esgoto da ETE-Alegria.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos do lodo de esgoto analisados durante dois anos de coletas

| Dados | Unidade | Jan/ano1 | Jul/ano1 | Nov/ano1 | Mar/ano2 | Ago/ano2 | Dez/ano2 | Média±DP |
|-------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| pH | | 6.7±0.3 | 7.1±0.2 | 7.3±0.4 | 7.1±0.3 | 7.4±0.1 | 7.4±0.1 | 7.15±0.26 |
| ST | % | 4 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2.16±1.16 |
| Alk | mgCaCO ₃ /L | 2396±143 | 2380±160 | 2370±152 | 2185±146 | 2382±124 | 2564±113 | 2379±120 |
| DQO | mg/L ⁻¹ | 21819±312 | 23646±340 | 22734±360 | 23915±311 | 21903±303 | 24309±310 | 23054±1060 |
| COT | mg/L ⁻¹ | nm | nm | nm | 880±58 | 895±51 | 970±52 | 915±48 |

O Teste T-Pareado (Figura 43) evidenciou correlação positiva para todos os parâmetros físico-químicos analisados com força de correlação significativa para pH-DQO, ST-QDO, DQO-ALK, ST-DQO e correlação nula para pH-ALK e ST-ALK.

Figura 43. Plotagem do Teste-T pareado



Foram realizados 34 experimentos BMP. Em triplicatas (28 n) e em sextuplicatas (6 n). Foi mensurado o pH final (Tabela 9) em todos os experimentos. BMPs foram testados a

diferentes temperaturas: mesofílica ($32\pm 1^\circ\text{C}$, $35\pm 1^\circ\text{C}$ e $37\pm 1^\circ\text{C}$) e termofílica ($45\pm 1^\circ\text{C}$ e $55\pm 1^\circ\text{C}$) para diferentes padronizações experimentais (Tabela 10).

Tabela 9. Medição do pH inicial e final e temperatura nos experimentos.

| Exp | Temp | pHi | pHf | Exp | Temp | pHi | pHf |
|------------|--------------------|---------------|---------------|------------|--------------------|---------------|---------------|
| E1 | A | 7.07 ± 0.5 | 7.31 ± 0.1 | E18 | 35°C | 7.29 ± 0.3 | 7.11 ± 0.1 |
| E2 | A | 7.07 ± 0.3 | 7.35 ± 0.2 | E19 | 35°C | 7.29 ± 0.5 | 7.28 ± 0.2 |
| E3 | A | 6.95 ± 0.1 | 7.27 ± 0.5 | E20 | 35°C | 7.29 ± 0.1 | 7.33 ± 0.5 |
| E4 | A | 6.7 ± 0.2 | 7.45 ± 0.3 | E21 | 35°C | 6.9 ± 0.2 | 7.27 ± 0.1 |
| E5 | A | 7.07 ± 0.1 | 7.36 ± 0.1 | E22 | 35°C | 6.9 ± 0.2 | 7.16 ± 0.2 |
| E6 | 35°C | 7.07 ± 0.5 | 7.31 ± 0.2 | E23 | 37°C | 7.12 ± 0.1 | 7.32 ± 0.2 |
| E7 | 45°C | 6.95 ± 0.2 | 7.25 ± 0.5 | E24 | 37°C | 7.12 ± 0.2 | 7.18 ± 0.5 |
| E8 | 55°C | 6.95 ± 0.3 | 7.27 ± 0.1 | E25 | 37°C | 7.12 ± 0.5 | 7.29 ± 0.1 |
| E9 | 35°C | 6.95 ± 0.1 | 7.44 ± 0.3 | E26 | 37°C | 7.43 ± 0.1 | 7.6 ± 0.2 |
| E10 | 45°C | 6.95 ± 0.2 | 7.45 ± 0.2 | E27 | 37°C | 7.45 ± 0.3 | 7.63 ± 0.2 |
| E11 | 55°C | 7.13 ± 0.5 | 7.3 ± 0.2 | E28 | 37°C | 7.45 ± 0.2 | 7.65 ± 0.3 |
| E12 | 35°C | 7.11 ± 0.1 | 7.33 ± 0.3 | E29 | 37°C | 7.45 ± 0.2 | 7.55 ± 0.1 |
| E13 | 45°C | 7.11 ± 0.3 | 7.42 ± 0.1 | E30 | 37°C | 7.45 ± 0.5 | 7.53 ± 0.2 |
| E14 | 55°C | 7.11 ± 0.2 | 7.44 ± 0.5 | E31 | 37°C | 7.45 ± 0.1 | 7.26 ± 0.2 |
| E15 | 35°C | 7.11 ± 0.3 | 7.51 ± 0.1 | E32 | 37°C | 7.45 ± 0.3 | 7.25 ± 0.5 |
| E16 | 45°C | 7.11 ± 0.1 | 7.55 ± 0.2 | E33 | 37°C | 7.45 ± 0.2 | 6.95 ± 0.1 |
| E17 | 55°C | 7.11 ± 0.5 | 7.37 ± 0.5 | E34 | 37°C | 7.45 ± 0.1 | 6.87 ± 0.2 |

Diversos pesquisadores utilizaram experimentos BMP para a produção de CH_4 a partir de lodo de esgoto (SILLERO et al, 2023; ROMERO-GUIZA et al, 2021; ALVES et al, 2020; GROSSER et al, 2020; ABDUL AZIZ, 2019; PAOLINI, 2018; ELBESHBISHY et al., 2012) e uma das mais importantes variáveis que influenciam os resultados do BMP é a origem do inóculo (SILLERO et al, 2022; BAI et al, 2020; GU et al, 2020; YIN et al., 2018; KUNDU et al., 2017).

O inóculo é comprovadamente um catalisador do desempenho de processos anaeróbios. O crescimento do número de MO aumenta a degradação de substâncias orgânicas nos

substratos. A adição de inóculo ao digestor diminui a duração da bioestabilização, o que pode aumentar a produção de CH₄ (ABDUL AZIZ, 2019).

Tabela 10. Medição de alcalinidade, DQO e TOC do lodo de esgoto ETE-Alegria

| Experimento | Alcalinidade | DQO | TOC |
|-------------|-------------------------|-------------|----------|
| | mg CaCO ₃ /L | mg/L | mg/L |
| E1 - E11 | 2396 ± 143 | 21819 ± 312 | nm |
| E12 - E18 | 2380 ± 160 | 23646 ± 340 | nm |
| E19 - E21 | 2370 ± 152 | 22734 ± 360 | 880 ± 65 |
| E22 - E24 | 2185 ± 146 | 23915 ± 311 | 895 ± 72 |
| E25 - E27 | 2382 ± 124 | 21903 ± 303 | 895 ± 64 |
| E28- E34 | 2564 ± 114 | 24309 ± 310 | 970 ± 69 |

3.2 Ambiente mesofílico e termofílico

Experimentos BMP (E1 ao E3) foram conduzidos em triplicata a diferentes temperaturas (35±1°C, 45±1°C e 55±1°C) utilizando-se o LE anaeróbico da ETE-Alegria para testar operacionalmente a melhor temperatura para a realização dos ensaios.

Segundo o documento PROBIOGÁS (2019), para que os MO se desenvolvam da melhor maneira possível e gerem quantidades satisfatórias de biogás é recomendado que calor externo seja fornecido. A Figura 46 e a Tabela 11, demonstram os dias de produção e o volume médio de CH₄ produzido.

Os experimentos BMP comparativos para a produção de biogás CH₄ a diferentes temperaturas (mesofílica e termofílica) em banho termostático (Figura 44), indicam que a 45 ± 1 °C o arranque da reação é maior, se comparado as outras duas temperaturas testadas (35 ± 1 °C e 55 ± 1 °C, mas o rendimento do CH₄ (103 ± 16 mL CH₄ g SV) e os dias de operação (7 dias) são menores.

Sob condições termofílicas (55 ± 1 °C), houve a segunda maior produção para o rendimento do CH₄, 115±13 mL CH₄ g SV em 8 dias. Considerando as condições estabelecidas no laboratório, a temperatura mesofílica 35 ± 1 °C promove uma maior produção no volume de metano – 140 ± 12 mL CH₄ g SV em 9 dias.

Figura 44. Comparação da produção média de CH₄ a diferentes temperaturas. Valor médio de CH₄ obtido em triplicatas.

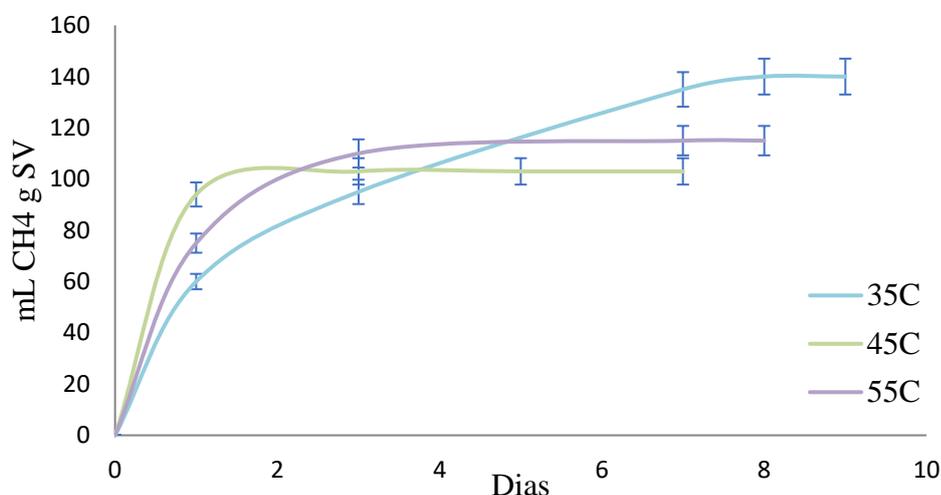


Tabela 11. Comparativo da produção do rendimento do metano submetido a diferentes temperaturas.

| Temperatura | Tempo (dias) | mL CH ₄ g SV (média±dv) |
|-------------|--------------|------------------------------------|
| 35±1 °C | 9 | 140 ± 12 |
| 45±1 °C | 7 | 103 ± 16 |
| 55±1 °C | 8 | 115 ± 13 |

O crescimento dos MO metanogênicos é favorecido em ambientes mesofílico e termofílico. Os organismos termofílicos, por sua vez, possuem taxa de crescimento específico de duas a três vezes maior do que os mesofílicos e conseqüentemente, sua taxa de decaimento é igualmente mais alta (EL-MASHAD et al., 2004).

Segundo ABENDROTH et al (2017), altas temperaturas (45 a 70°C) favorecem a produção de ácidos voláteis e principalmente, de amônia, diminuindo a atividade metanogênica e o rendimento na produção do biogás.

Segundo Magalhães (2018), a faixa de temperatura em que atuam os MO metanogênicos mesofílicos é entre 25°C e 40°C, porém o processo de geração de biogás tem maior rendimento

acima de 32°C, sendo a temperatura ideal para a formação do CH₄ entre 35°C e 37°C (ANGELIDAKI et al, 2018).

3.3 Armazenamento do lodo

A capacidade de produção de CH₄ utilizando LE em diferentes condições de armazenamento (resfriado e congelado) (Figura 45 e Tabela 12) também foi comparada através de ensaios BMP em triplicata (E4 ao E6).

Figura 45. Comparação da produção de metano sob diferentes condições de armazenamento.

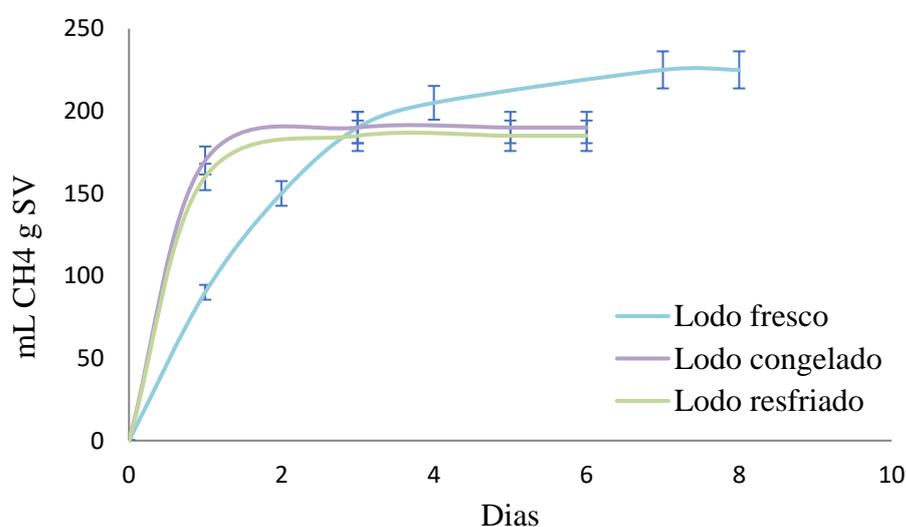


Tabela 12. Comparação da produção de CH₄ com diferentes tipos de armazenamento do lodo.

| Experimento | Tempo (dias) | mL CH ₄ g SV (média±dp) |
|----------------|--------------|------------------------------------|
| Lodo fresco | 9 | 225±18 |
| Lodo resfriado | 6 | 185±15 |
| Lodo congelado | 6 | 190±16 |

As curvas de produção metanogênica para o lodo resfriado e congelado (185 ± 15 e 190 ± 16 mL CH₄ g SV), indicam que o congelamento e o resfriamento do LE são muito próximos quanto aos valores produzidos para o rendimento do CH₄ e em relação ao arranque da produção. O lodo fresco apresentou maior rendimento de produção (225 ± 18 mL CH₄ g SV) em 9 dias.

O LE denominado fresco é o lodo coletado no biodigestor da ETE-Alegria e incubado nos experimentos BMP imediatamente após a coleta. Este lodo apresenta a maior produção de metano (225 ± 18 mL CH₄ g SV) se comparado ao LE resfriado e ao congelado. Porém, a diferença observada não inviabiliza a utilização do LE congelado ou resfriado para os ensaios BMP, o que possibilita a realização de diferentes experimentos a partir de um mesmo lodo, garantindo uma comparação mais robusta e confiável dos diferentes parâmetros operacionais testados.

3.4 Caracterização do substrato

A Tabela 13 mostra a caracterização físico-química do LE utilizado como feedstock nos ensaios BMP. O protocolo desenvolvido no laboratório permitiu implementar e desenvolver testes replicáveis e uma metodologia econômica para a avaliação BMP usando o LE da ETE-Alegria.

Para a validação do ensaio foi conduzido um experimento com seis réplicas. Os experimentos avaliaram a produção de CH₄ a partir de LE em temperatura mesofílica ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) para verificar o protótipo desenvolvido do laboratório e o sistema de vedação. Tal temperatura foi escolhida pois se mostrou mais estável para os experimentos BMP com LE conduzidos no laboratório.

Tabela 13. Parâmetros operacionais dos experimentos BMP para validação ADM1

| Operação | Unidade | BMP |
|-----------------|---------|----------------|
| Temperatura | °C | 37 ± 0.1 |
| Agitação | - | 2x dia |
| Volume total | mL | 250 |
| Volume trabalho | mL | 100 |
| Substrato | mL | Lodo de esgoto |
| Inóculo | mL | Lodo de esgoto |
| I/S ratio | v/v | 1:1 |

Mudanças discretas foram observadas no pH (7.43 ± 0.4 a 7.60 ± 0.6) após 11 dias de incubação no biorreator (Tabela 14), estando em acordo ao esperado para o crescimento dos MO e produção de biogás sem a necessidade de adição de solução tampão.

Tabela 14. Parâmetros físico-químicos do LE da ETE-Alegria.

| Parâmetros | Unidade | Lodo de Esgoto |
|--------------|---------------------------------------|----------------|
| pHi - pHf | - | 7.43 - 7.60 |
| ST | % | 2.0 |
| SVT | % | 1.1 |
| SSV | % | 0.8 |
| DQOti | mg L ⁻¹ | 21 903 ± 1000 |
| Alcalinidade | mg CaCO ₃ /L ⁻¹ | 2 382 ± 100 |
| COT | mg L ⁻¹ | 895 ± 100 |

Legenda: pHi (pH inicial); pHf (pH final média); %ST (sólidos totais); %SVT (sólidos voláteis totais), %SSV (sólidos suspensos voláteis); DOQti (demanda química de oxigênio total inicial); COT (carbono orgânico total).

Na DA do LE, onde as arqueias metanogênicas são essenciais no processo, a faixa ideal de pH deve ser próxima da neutralidade. Estudos confirmam que é possível estabilizar o processo em um intervalo de pH entre 6-8, sem comprometer o desenvolvimento das arqueias metanogênicas (WANDERA et al., 2019).

A alcalinidade (2.382 ± 100 mg CaCO₃ L⁻¹) e o valor de DQO total (21.903 ± 1.000 mg L⁻¹) (Tabela14) indicam a capacidade do lodo de neutralizar a reação e a capacidade de consumo de oxigênio durante a oxidação da matéria orgânica (MaO) do lodo em CO₂ e água.

O TOC (895 ± 100 mg CaCO₃ L⁻¹) é o carbono na MaO oxidado e medido através da liberação como CO₂. Os processos biológicos residem na capacidade da MaO em utilizar compostos orgânicos biodegradáveis e transformá-los em subprodutos (Lucas et al., 2015).

Em relação à série de sólidos, os seguintes resultados foram obtidos após a caracterização do LE (Tabela 14): sólidos totais (ST) 2,0%, sólidos voláteis totais (SVT) 1,1%

e sólidos suspensos voláteis (SSV) 0,8%. Isso sugere que o lodo anaeróbio contém mais compostos orgânicos do que inorgânicos. A quantidade de biometano produzido está relacionada à massa de SV nessas amostras.

O resultado para alcalinidade demonstra que o lodo da ETE-Alegria está dentro do limite para os processos de DA, além de ter valores próximos aos obtidos em outros estudos com lodo de esgoto em ETes. Grosser et al. (2020) investigou a produção de biogás de LE em sistemas BMP de ETE na Polônia e obteve alcalinidade de $2386 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Bai et al. (2020), em experimentos BMP com lodo de esgoto de ETE nos Estados Unidos, obtiveram alcalinidade $2500 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Salehyoun et al. (2020) mensuraram alcalinidade de $2447 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ em LE de ETE no Irã.

A demanda química total de oxigênio (DQOt) foi de $21903 \pm 100 \text{ mg/L}^{-1}$ e $16502 \pm 336 \text{ mg/L}^{-1}$, sendo valores similares aos obtidos em outros estudos com lodo de esgoto em ETes (Angelidaki et al. 2018; Labatut et al. 2011; Park et al, 2021; Zhao et al. 2019).

A DQO indica a capacidade de consumo do oxigênio durante a oxidação da matéria orgânica do lodo em CO_2 e H_2O . Sabe-se que a produção de biogás está associada a energia da DQO convertida em biogás metano (DIVYA et al. 2015) e representa a energia química disponível presente na matéria orgânica. Os MO convertem energia química a CH_4 , o que pode ser diretamente associado com a energia máxima a ser recuperada como biogás (RAPOSO et al. 2011).

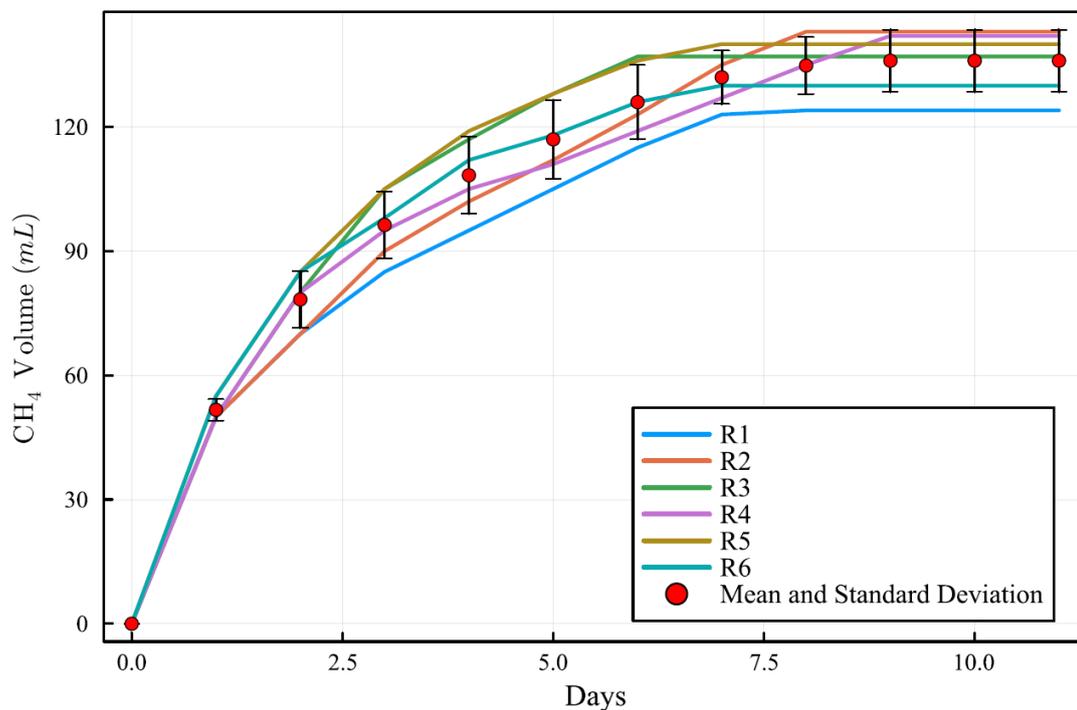
De acordo com a normatização alemã para fermentação anaeróbia VDI (2006) mais de 90% da produção de metano deve ser alcançada após 5 dias de incubação, independentemente da fonte de inóculo. Tal fato é observado nos experimentos BMP desenvolvidos no laboratório para a validação do teste.

3.5 Avaliação do potencial de produção de metano do lodo da ETE - Alegria

As curvas de produção acumulada de CH_4 (Figura 46) estão dentro de uma faixa estreita de valores, e a curva de desvio padrão (Figura 47) mostra que os reatores BMP alcançaram uma boa reprodutibilidade.

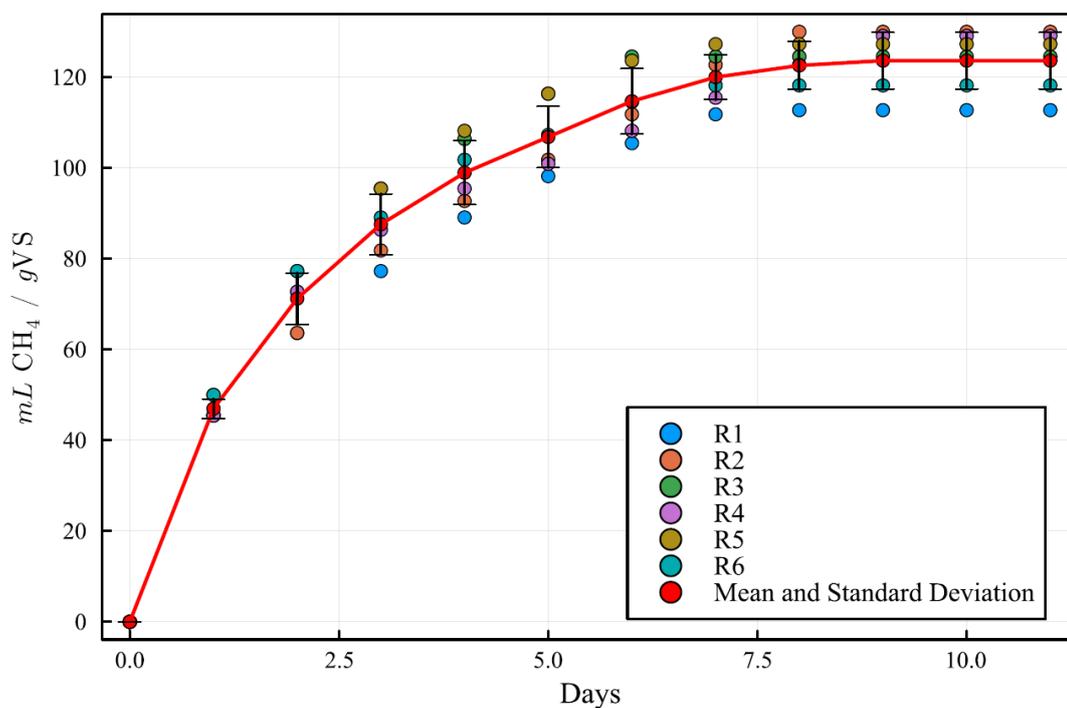
A rodada de experimentos (R1 a R6) produziu os seguintes valores de CH_4 (Tabela 15): 124, 143, 137, 142, 140 e 130 NmL de CH_4 . Esses resultados indicam que os ensaios BMP foram precisos e eficazes.

Figura 46. Produção acumulada de metano em seis réplicas experimentais R1 - R6.



Legenda: R1 - R6 (124, 143, 137, 142, 140 e 130 NmL CH₄, respectivamente) para validação do protocolo estabelecido no presente estudo. Valor médio obtido com o desvio padrão.

Figura 47. Rendimento da produção de metano R1 ao R6



Legenda: Rendimento da produção de metano R1 ao R6 (113, 130, 124, 129, 127 e 118 mL CH₄ / g VS, respectivamente).

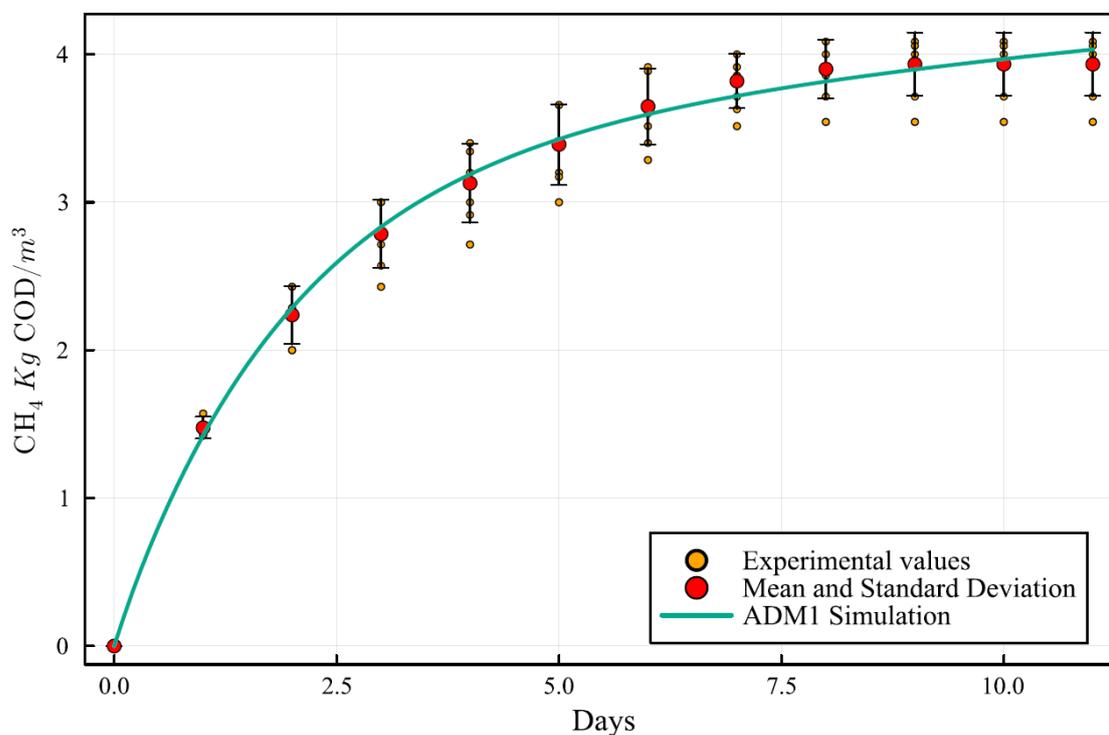
Tabela 15. Produção de metano.

| Experimento | R1 | R 2 | R 3 | R 4 | R5 | R 6 | Média \pm d.v |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
| CH ₄ (NmL) | 124 | 146 | 137 | 142 | 140 | 130 | 137.6 \pm 6.39 |
| CH ₄ yield (mL CH ₄ g ⁻¹ VS) | 113 | 130 | 124 | 129 | 127 | 118 | 124 \pm 6.72 |
| CH ₄ yield (mL CH ₄ g ⁻¹ COD) | 5.6 | 6.5 | 6.2 | 6.1 | 5.9 | 6.3 | 6.15 \pm 0.9 |

Durante os ensaios BMP, as curvas de produção de biogás podem seguir padrões diversos (BATSTONE et al., 2015), e esses padrões têm implicações significativas (LABATUT et al., 2011). A temperatura desempenha um papel crucial nas interações microbianas e afeta a estabilidade e o desempenho da DA, assim como o equilíbrio termodinâmico das reações bioquímicas no processo de DA (LIN et al., 2017).

O arranjo proposto para o ensaio BMP permitiu a medição diária do volume de biogás, o que resultou em resultados satisfatórios (Tabela 15 e Figura 48).

Figura 48. Curva metanogênica ensaio experimental BMP versus simulação ADM1



Legenda: Curva metanogênica obtida com o ensaio experimental de BMP versus curva obtida com a simulação computacional utilizando o modelo de simulação ADM1.

A solução alcalina utilizada no arranjo reteve eficientemente o CO₂ produzido. Além disso, os ensaios BMP foram conduzidos em temperatura mesofílica, o que contribuiu para a estabilidade do sistema. Reatores mesofílicos são preferidos para biomassa facilmente biodegradável (ISSAH et al., 2020). A produção de CH₄ foi de 113, 130, 124, 129, 127 e 118 mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹ nos reatores R1 a R6, respectivamente. Esses resultados demonstram a eficácia e a precisão das rodadas experimentais realizadas nos ensaios BMP.

A Tabela 16 mostra a DQO final (tCODf) e a taxa de biodegradabilidade (23 a 28%) para cada reator BMP. O rendimento de CH₄ pode ser normalizado tanto por volume de substrato (mL CH₄ L⁻¹), massa de sólidos voláteis do substrato (mL CH₄ g⁻¹ VS), ou massa de demanda química de oxigênio (DQO) do substrato (mL CH₄ g⁻¹ CODsub).

O último método permite a conversão direta dos resultados em porcentagem de matéria orgânica convertida em metano, usando o cálculo teórico de 0,350 m³ CH₄ por kg de COD convertido (MCCARTY, 1964).

Tabela 16. Biodegradabilidade das amostras ao final da DA em ensaios BMP (n = 6).

| Experimentos | pH _{final} | DQOf (mg/L) | DQO redução (%) |
|--------------|---------------------|-------------|-----------------|
| R 1 | 7.4 | 16820 | 23.21 |
| R 2 | 7.45 | 15680 | 28.42 |
| R 3 | 7.5 | 16714 | 23.7 |
| R 4 | 7.6 | 16316 | 25.51 |
| R 5 | 7.45 | 16512 | 24.68 |
| R 6 | 7.55 | 16970 | 23.35 |

3.6 Simulação computacional ADM1 combinada

Os resultados da simulação, utilizando os dados mencionados acima, são apresentados na Tabela 16 e mostrados na Figura 48, juntamente com os resultados do ensaio BMP. A curva de produção simulada é muito semelhante à obtida no ensaio BMP, indicando que o modelo ADM1 combinado pode reproduzir os resultados esperados. Isso torna a simulação

computacional (SC) uma ferramenta útil para elaborar e planejar experimentos laboratoriais.

As Tabelas 17 e 18 mostram a composição do LE de acordo com o modelo ADM1, aplicando o método de otimização iterativa e com base no valor real inicial da DQO do LE no substrato do ensaio BMP.

Tabela 17. Entrada do modelo ADM1 do biodigestor.

| Variables | Value | Unit |
|-----------|----------|------------------------|
| S_su | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| S_aa | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_fa | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_va | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_bu | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_pro | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_ac | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_h2 | 1.0E-8 | Kg COD/ m ³ |
| S_ch4 | 1.0E-5 | Kg COD/ m ³ |
| S_IC | 0.04 | kmole C/m ³ |
| S_IN | 0.01 | kmole N/m ³ |
| S_I | 0.02 | Kg COD/ m ³ |
| X_xc | * 40.769 | Kg COD/ m ³ |
| X_ch | 0.00 | Kg COD/ m ³ |
| X_pr | * 8.127 | Kg COD/ m ³ |
| X_li | *0.252 | Kg COD/ m ³ |
| X_su | 0.00 | Kg COD/ m ³ |
| X_aa | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_fa | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_c4 | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_pro | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_ac | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_h2 | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_I | * 0.087 | Kg COD/ m ³ |
| S_cat | 0.04 | kmole/m |

Legenda: Os valores para compostos complexos, proteínas, lipídios, partículas inertes, destacados com '*', são determinados pela rotina de otimização.

Os dados na Tabela 17 mostram que o influxo de AR é bem caracterizado, basicamente, por uma mistura de compostos complexos ($40.769 \text{ Kg COD m}^{-3}$), com uma pequena adição de proteínas ($8.127 \text{ Kg COD m}^{-3}$) e quantidades traço adicionais de lipídios ($8.127 \text{ Kg COD m}^{-3}$) e partículas inertes ($0.087 \text{ Kg COD m}^{-3}$).

É importante destacar que a categoria de compostos complexos no modelo ADM1 resulta em uma distribuição predefinida de carboidratos, proteínas, lipídios e matéria particulada inerte quando hidrolisados. Assim, o efeito líquido de incluir proteínas, lipídios e partículas inertes adicionais é corrigir a composição padrão do composto complexo e produzir resultados de simulação que se aproximam melhor dos dados observados.

Os resultados obtidos pelo modelo ADM1 foram muito próximos aos obtidos experimentalmente no teste BMP, ilustrando a qualidade do modelo proposto pela International Water Association (IWA). Ao utilizar este modelo em conjunto com um método iterativo de mínimos quadrados, foi encontrada uma composição detalhada do SWS consistente com os dados do BMP (Tabela 18).

Table 18. ADM1 model AR output variables and BMP initial composition.

| Sludge composition and model variables (Kg COD/m ³) | | | |
|---|--------------------------|------------------------|---------------------------------|
| $x_{01} = 1.5031e-02$ | S_su, Monosaccharide | $x_{013} = 5.0183e+00$ | X_c, Complex Composite |
| $x_{02} = 6.7129e-03$ | S_aa, Amino Acid | $x_{014} = 4.9515e-02$ | X_ch, Carbohydrate |
| $x_{03} = 1.2853e-01$ | S_fa, LCFA | $x_{015} = 1.5778e-01$ | X_pr, Proteins |
| $x_{04} = 1.4532e-02$ | S_va, Total Valerate | $x_{016} = 7.7605e-02$ | X_li, Lipids |
| $x_{05} = 1.6795e-02$ | S_bu, Total Butyrate | $x_{017} = 6.0868e-01$ | X_su, Sugar Consumers |
| $x_{06} = 2.0244e-02$ | S_pro, Total Propionate | $x_{018} = 1.4414e+00$ | X_aa, Amino Acid Consumers |
| $x_{07} = 4.2027e-02$ | S_ac, Total Acetate | $x_{019} = 4.9932e-01$ | X_fa, LCFA Consumers |
| $x_{08} = 0.00$ | S_h2, Hydrogen Gas | $x_{020} = 5.2954e-01$ | X_c4, Valerate/Butyrate Consum. |
| $x_{09} = 0.00$ | S_ch4, Methane Gas | $x_{021} = 1.6868e-01$ | X_pro, Propionate Consumers |
| $x_{010} = 6.3799e-01$ | S_IC, Inorganic Carbon | $x_{022} = 1.0750e+00$ | X_ac, Consumers of Acetate |
| $x_{011} = 1.2453e-01$ | S_IN, Inorganic Nitrogen | $x_{023} = 4.5639e-01$ | X_h2, Hydrogen Consumers |
| $x_{012} = 3.7066e+00$ | S_I, Inert Soluble | $x_{024} = 7.5005e+00$ | X_I, Inert Particulate |

A Tabela 18 mostra as principais concentrações presentes no lodo de AR, que incluem partículas inertes, compostos complexos, solúveis inertes e consumidores de aminoácidos. A

composição do lodo de AR indica uma diminuição significativa na concentração de compostos complexos (para aproximadamente 5 Kg COD m⁻³) e um aumento considerável nas concentrações de partículas inertes e solúveis inertes.

Os resultados na Tabela 18 foram obtidos por cálculos numéricos e referem-se à saída da composição modelada da digestão anaeróbia, alimentando o modelo BMP que melhor se aproxima dos resultados experimentais do teste BMP.

A baixa concentração do composto X_c, quando comparada às concentrações inerentes X_i e S_i, é consistente com uma composição das variáveis de saída de uma digestão anaeróbia, onde o X_c sofre um consumo eficiente. Além disso, os altos valores de X_{aa} e X_{ac}, quando comparados às outras cinco frações de biomassa, são compatíveis com resultados encontrados em outras simulações de digestão anaeróbia e resultados experimentais.

A concentração total de acetato é alimentada por seis processos (com taxas de processo bioquímico ρ_5 a ρ_{10}), resultando em uma concentração de acetato comparativamente mais alta do que cada uma das seis fontes originais. Além disso, os consumidores de acetato não possuem um metabolismo mais rápido em comparação com outros consumidores no processo. Por exemplo, $K_{m_{ac}} = 8 \text{ d}^{-1}$, enquanto $K_{m_{pro}} = 6 \text{ d}^{-1}$. Combinando esses dois fatores (maior concentração de acetato e taxas de processo bioquímico relativamente lentas para consumidores de acetato), uma massa maior de consumidores de acetato X_{ac} é necessária para consumir os resultados da produção da via metabólica acetogênica. Se não for devidamente considerada, a alta concentração de acetato pode levar à redução da produção de metano devido à inibição dos metanogênicos acetoclásticos causada pelo baixo pH.

Por outro lado, a carga de proteína na alimentação é relativamente alta, e a produção de aminoácidos é proporcionalmente elevada, portanto, uma massa maior de consumidores de aminoácidos X_{aa} é encontrada na saída do processo de digestão anaeróbia quando o processo atinge um estado estacionário. Uma concentração relativamente alta de proteínas, em relação a carboidratos e lipídios, não é incomum em águas residuais em climas tropicais.

Ao comparar os resultados do modelo ADM1 com as medições experimentais dos ensaios BMP, uma composição equivalente foi obtida (Tabela 18 e Figura 50). Com base na semelhança dos resultados, pode-se concluir que o modelo é adequado para caracterizar o SWS e o potencial de produção de biogás.

A Tabela 19 fornece uma comparação numérica entre os resultados experimentais de produção de CH₄ do BMP e os resultados computacionais do modelo ADM1, mostrando uma discrepância máxima de menos de 2,8%. Com base na semelhança dos resultados, pode-se

concluir que o modelo é adequado para caracterizar o LE (solubilização de resíduos sólidos) e o potencial de produção de biogás.

Tabela 19. Comparação da produção de CH₄ entre o experimento BMP e o resultado do modelo computacional ADM1 (mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹)

| Dias | CH ₄ BMP | CH ₄ ADM1 | Erro (%) |
|------|---------------------|----------------------|----------|
| 0 | 0 | 0.0000 | 0 |
| 1 | 46.9697 | 46.4013 | -1.2101 |
| 2 | 71.2121 | 72.8888 | 2.3545 |
| 3 | 87.5758 | 89.5668 | 2.2735 |
| 4 | 98.4848 | 100.3918 | 1.9363 |
| 5 | 106.3636 | 107.6856 | 1.2429 |
| 6 | 114.5455 | 112.8359 | -1.4925 |
| 7 | 120.0000 | 116.6777 | -2.7685 |
| 8 | 122.5758 | 119.7153 | -2.3336 |
| 9 | 123.6364 | 122.2534 | -1.1186 |
| 10 | 123.6364 | 124.4768 | 0.6797 |
| 11 | 123.6364 | 126.4973 | 2.3140 |

3.7 Resultados da validação da implementação do modelo ADM1 em Julia baseado em EAD (Equações Algébrico-Diferenciais)

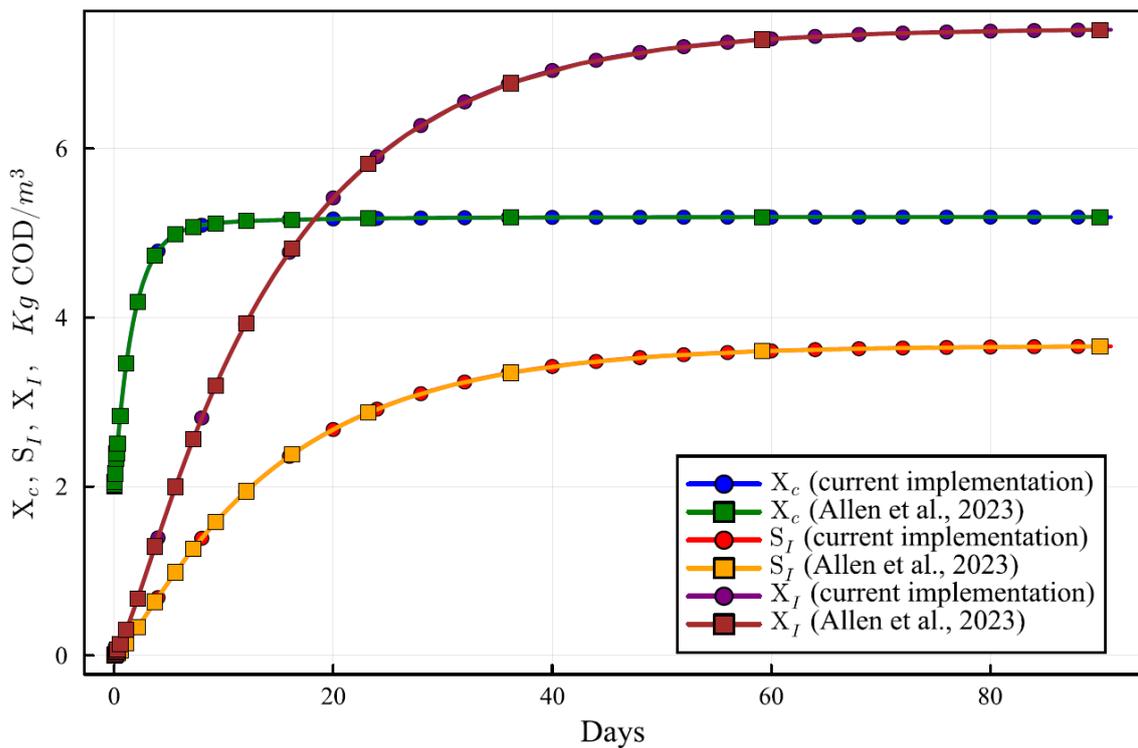
A nova implementação do modelo DAE-ADM1 na linguagem Julia foi validada comparando os resultados com a implementação em Julia baseada em Equações Diferenciais Ordinárias - EDO (ALLEN et al., 2023). Testes de validação foram realizados em vários problemas de referência, mostrando boa concordância. Nesta seção, apresentamos os resultados do teste realizado nos dados obtidos na seção anterior (Tabelas 16 e 17), com o objetivo de validar os resultados das simulações realizadas neste trabalho.

As Figuras 6 a 10 apresentam os resultados da simulação do lodo de AR utilizando a atual implementação de EAD, comparada aos resultados obtidos pela implementação de EAD

de Allen et al. 2023. Os testes de validação demonstram que os resultados têm uma concordância muito boa, tanto para os resultados de estado estacionário quanto para os resultados do regime transitório, proporcionando assim uma validação quantitativa da nova implementação.

As curvas dependentes do tempo (figuras 49 a 53) mostram que, enquanto algumas concentrações atingem o valor de estado estacionário logo após o início (cerca de 10 dias, como é o caso de X_c), a maioria das concentrações só atinge o estado estacionário após um período muito mais longo (tipicamente 60 dias, como no caso de X_{su}). No entanto, pode-se observar que as concentrações não variam após 80 dias, indicando que o período de simulação atual de 90 dias é suficiente para que o lodo de AR alcance condições de estado estacionário.

Figura 49. Curvas de concentração de X_c , S_I e X_I obtidas com a simulação computacional do AR usando a implementação atual do modelo DAE-ADM1

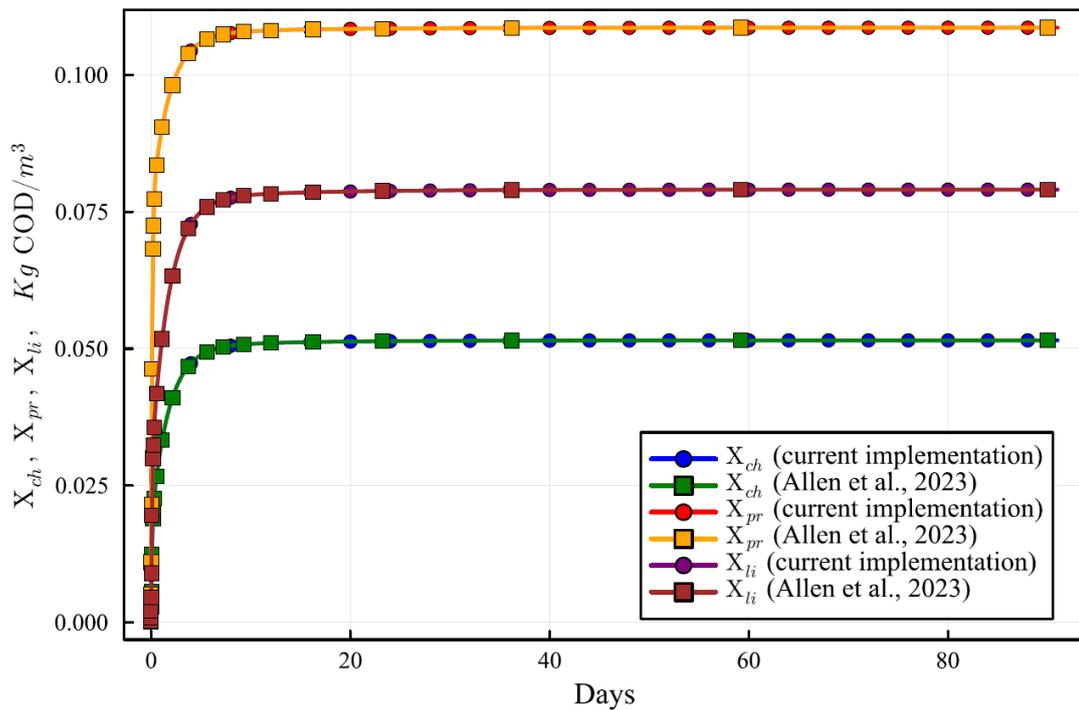


Legenda: A implementação atual do modelo DAE-ADM1, comparadas com os resultados obtidos com o modelo ODE-ADM1 (Allen et al., 2023). Linhas com círculos correspondem a valores obtidos nas simulações atuais. Curvas com quadrados são obtidas com o modelo ODE-ADM1, mostrando resultados praticamente idênticos.

O tempo computacional da atual implementação em Julia baseada em EAD é favorável em comparação com a implementação em Julia baseada em EDO por um fator considerável. O tempo médio de execução para a simulação do lodo de AR com a atual implementação baseada em EAD é de 22,15 ms, enquanto com a implementação baseada em EDO (ALLEN et al., 2023), o tempo médio de execução é de 1231 ms.

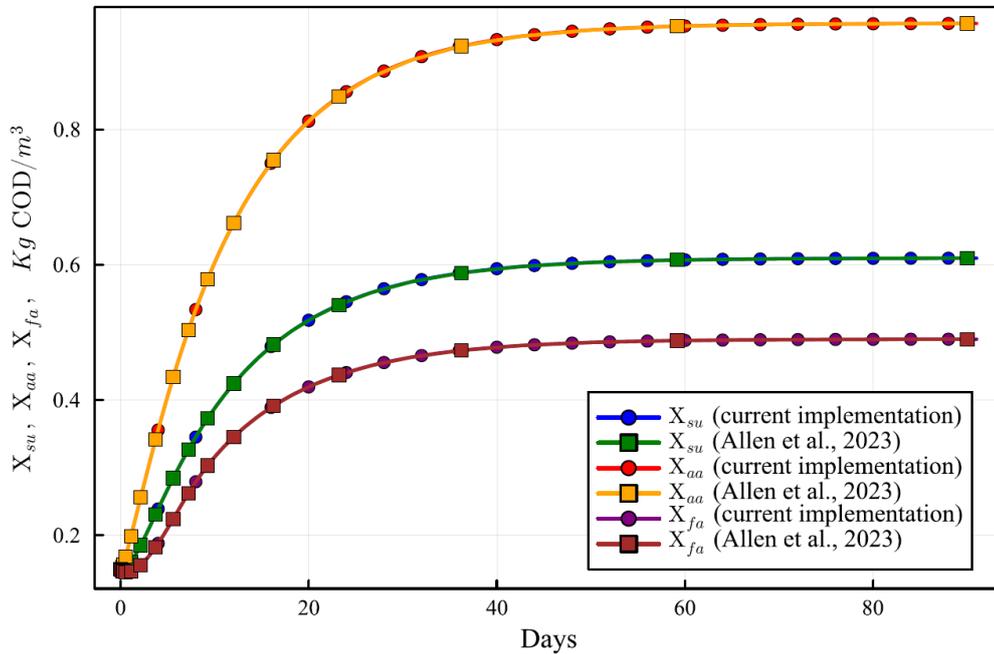
Portanto, a implementação atual baseada em EDO é aproximadamente 56 vezes mais rápida do que a implementação baseada em EAD. Assim, a nova implementação é mais adequada para realizar estimativas de parâmetros do modelo e otimização de parâmetros operacionais. Os testes foram realizados em um processador Intel(R) Core(TM) i7-1060NG7 @ 1.20GHz, com 16GB de memória LPDDR4X a 3733 MHz, macOS Ventura 13.5.2 e Julia v1.9.

Figura 50. Curvas de concentração de X_{ch} , X_{pr} e X_{li} obtidas com a simulação computacional do AR



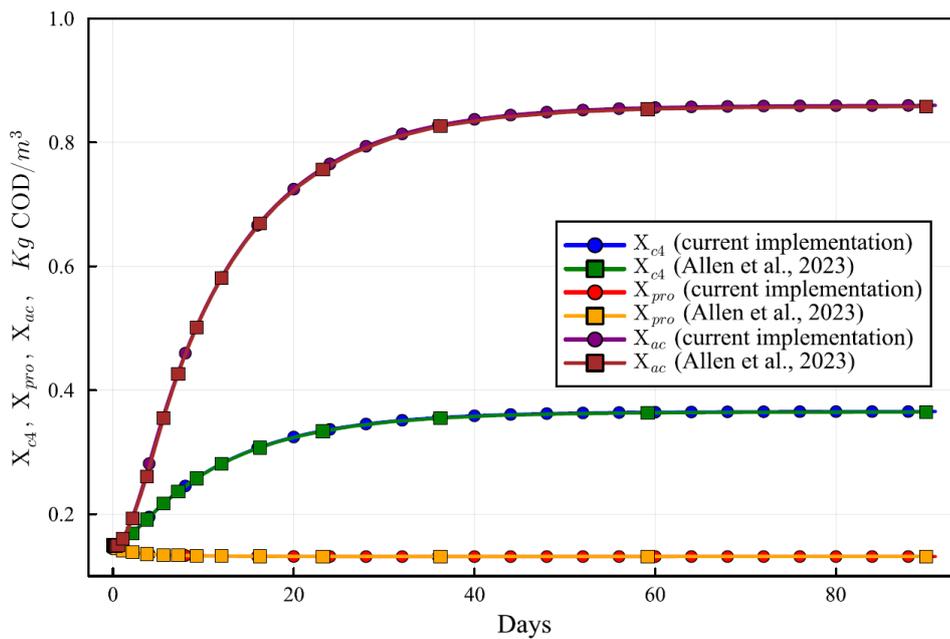
Legenda: utilizando a implementação atual do modelo DAE-ADM1, comparadas com os resultados obtidos com o modelo ODE-ADM1 (Allen et al., 2023). Linhas com círculos correspondem a valores obtidos nas simulações atuais. Curvas com quadrados são obtidas com o modelo ODE-ADM1, mostrando resultados praticamente idênticos.

Figura 51. Curvas de concentração de X_{su} , X_{aa} e X_{fa} obtidas com a simulação computacional do AR



Legenda: utilizando a implementação atual do modelo DAE-ADM1, comparadas com os resultados obtidos com o modelo ODE-ADM1 (Allen et al., 2023).

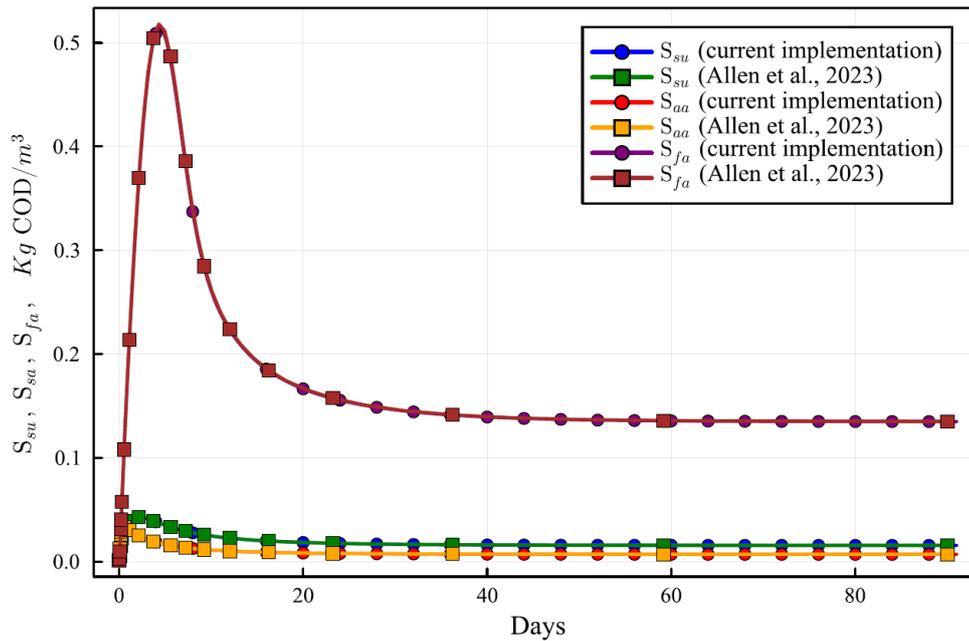
Figura 52. Curvas de concentração de X_{c4} , X_{pro} e X_{ac} obtidas com a simulação computacional do AR



Legenda: utilizando a implementação atual do modelo DAE-ADM1, comparadas com os resultados obtidos com o modelo ODE-ADM1 (Allen et al., 2023). Linhas com círculos

correspondem a valores obtidos nas simulações atuais. Curvas com quadrados são obtidas com o modelo ODE-ADM1, mostrando resultados praticamente idênticos

Figura 53. Curvas de concentração de S_{su} , S_{aa} e S_{fa} obtidas com a simulação computacional do AR



Legenda: utilizando a implementação atual do modelo DAE-ADM1, comparadas com os resultados obtidos com o modelo ODE-ADM1 (Allen et al., 2023). Linhas com círculos correspondem a valores obtidos nas simulações atuais. Curvas com quadrados são obtidas com o modelo ODE-ADM1, mostrando resultados praticamente idênticos.

3.8 Parâmetros operacionais e produção de biogás

A estabilidade do pH na digestão anaeróbia (DA) é o principal fator de controle no equilíbrio do sistema (ISSAH et al., 2020). Nenhum ajuste de pH foi feito durante os ensaios BMP devido à capacidade tampão do LE. A agitação duas vezes ao dia dos recipientes de digestão permitiu a liberação de gás durante os ensaios, evitando ao mesmo tempo o entupimento das válvulas de conexão. A produção de biogás diminuiu quando o valor de pH é superior a 7,6 ou inferior a 6,8 (PILARSKI et al., 2020). Variáveis do processo, como temperatura e pH, são os principais fatores que afetam o processo de digestão (CASTELLANO-HINOJOSA et al., 2018). Em temperaturas muito altas ou muito baixas, as atividades

bacterianas e arqueais podem ser reduzidas, resultando em baixos rendimentos, e um pH desequilibrado pode resultar na acumulação de ácidos graxos voláteis (AGV), o que pode levar à mortalidade de microrganismos (ISSAH et al., 2020), especialmente os metanogênicos.

Valores elevados de alcalinidade indicam que a reação está tamponada, de modo que o pH não sofre grandes alterações (ANGELIDAKI et al., 2013). O valor de alcalinidade do LE neste estudo ($2.382 \pm 100 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) é semelhante à alcalinidade encontrada em outros LE de ETEs, conforme observado por Grosser et al. (2020), que investigaram o BMP de LE de uma ETE na Polônia ($2.823 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$).

O valor de tCOD ($21.903 \pm 1000 \text{ mg L}^{-1}$) é consistente com valores encontrados em outros estudos, como 25.250 mg L^{-1} por Park et al. (2021) e 22.300 mg L^{-1} por Wickman et al. (2018). Como a matéria orgânica converte energia química em CH_4 , isso está diretamente associado à energia máxima que pode ser recuperada como biogás (RAPOSO et al., 2012). O inóculo retirado de um digestor anaeróbico ativo (AR) que está digerindo matéria orgânica complexa (OM) e está em estado estacionário no momento da coleta proporciona uma comunidade microbiana altamente diversificada, capaz de digerir uma grande variedade de moléculas orgânicas (HOLLIGER et al., 2016).

Estudos com resultados semelhantes para a mono-digestão de LE são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20. Produção de metano em lodo de esgoto de ETE por outros autores

| Tipo reator | SO | Temp | HRT | Ym ($\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ VS}^{-1}$) | Author |
|-------------|----|------|-----|---|--------------------|
| Batch BMP | LE | 37 | 20 | 138.2 | Alves et al. 2020 |
| Batch | LE | 35 | n.a | 182 | Bai et al. 2020 |
| Batch BMP | LE | 37 | n.a | 124.4 | Pan et al. 2019 |
| Batch BMP | LE | 35 | n.a | 182 | Ripoll et al. 2020 |
| BMP | LE | 35 | 13 | 159 | Xie et al. 2020 |
| BMP | LE | m | 35 | 121 | Kashi et al. 2017 |
| Batch | LE | 35 | 40 | 88.1 | Zou et al. 2018 |
| Batch | LE | 35 | 10 | 135.6 | Xie et al. 2020 |
| Batch | LE | 37 | 35 | 142.7 | Zhang et al. 2014 |
| Batch BMP | LE | 37 | 11 | 124 | Presente estudo |

Legenda: SO (substrato orgânico); LE (lodo de esgoto); PS (primary sludge); m (mesophilic); Ym (CH_4 yield); n.a. (not available).

A mono-digestão de LE revelou os seguintes resultados relatados por Alves et al. (2020) (138,2 mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹), Pan et al. (2019) (124,43 mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹), Park et al. (2021) (100-175 mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹) e Zou et al. (2018) (88,1 mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹). O setor de saneamento, com o uso de DA de LE, tem a possibilidade de transformar um passivo ambiental em um ativo energético.

3.9 Teor de carbono e biodegradabilidade do lodo

A taxa de biodegradabilidade alcançada no presente estudo é consistente com as porcentagens de redução de DQO relatadas em estudos anteriores baseados em ensaios BMP de LE, como Maragkaki et al. (2018), Kashi et al. (2017) e Zhang et al. (2016), que alcançaram porcentagens de redução de 28,9%, 16,0% e 25,2%, respectivamente.

A matéria orgânica é medida pela quantidade de carbono em uma matéria-prima (FERGUSON et al., 2018; GOHIL et al., 2018), e o rendimento de biometano é afetado pelo teor de SV (MAYER et al., 2014). Portanto, a produção de CH₄ está diretamente relacionada à degradação de SV (ANGELIDAKI et al., 2009), sendo os SV o componente de matéria orgânica dos ST.

Os sistemas utilizados na DA são classificados de acordo com a porcentagem de ST na matéria-prima (YI et al., 2014). O rendimento de biogás depende principalmente do teor de compostos orgânicos na matéria-prima, incluindo gorduras, proteínas e carboidratos, que são biologicamente degradáveis sob condições de DA (ABDUL AZIZ et al., 2019).

A MO anaeróbia pode ser inibida por substâncias presentes no substrato ou por compostos gerados no próprio metabolismo (MUSTAPHA et al., 2018). O potencial de produção bioquímica de metano dos substratos destinados à DA e suas cargas orgânicas específicas podem ser utilizados para projetar vários componentes de plantas de DA em escala real, incluindo o tamanho dos digestores e o potencial para utilizar o biogás gerado (FILER et al., 2019).

O LE é um inóculo ideal para ensaios BMP devido à diversidade de sua população microbiana (RAPOSO et al., 2011). Uma DA bem-sucedida deve conter uma comunidade de consórcio microbiano equilibrada para uma produção eficiente de biogás (ISSAH et al., 2020). Os resultados experimentais mostraram que o LE obtido de uma ETE municipal possuem a capacidade de produzir CH₄, sendo considerado uma estratégia viável para a produção de bioenergia.

As propriedades de biodegradabilidade dos substratos e a produção de produtos intermediários inibitórios controlarão principalmente a cinética das diferentes etapas da DA e

definirão a forma da curva de produção de biogás, identificando características importantes dos substratos e antecipando problemas na digestão (LABATUT et al., 2011).

A DQO é comumente usada para medir a força orgânica de efluentes líquidos. Em ETEs, cada quilograma de DQO removido produzirá 0,35 m³ de gás CH₄ em temperatura e pressão padrão (JINGURA and KAMUSOKO, 2017). O rendimento teórico de CH₄ pode ser calculado a partir da DQO de um substrato, e a produção de biogás em relação a DQO é cerca de 0,5 L g⁻¹ de DQO removido, correspondendo a uma produção de CH₄ de aproximadamente 0,35 L g⁻¹ de DQO removido (ANGELIDAKI and SANDERS, 2004).

3.10 Viabilidade de utilização do modelo como uma ferramenta para prever resultados em ensaios BMP/ Utilização do modelo como ferramenta para prever resultados

A SC no ADM1 pode ser utilizada para comparar a diminuição de DQO observada experimentalmente com os valores obtidos a partir da simulação numérica. Além disso, o modelo pode ser validado comparando e calibrando a atividade metanogênica e as curvas de produção. Processos de DA são conduzidos em condições de laboratório e dimensionados para ensaios em escala piloto.

A metodologia proposta pode ser aplicada para apoiar o desenvolvimento de experimentos e projetos de reatores em escala real. A escalabilidade e transferibilidade dos dados do ensaio BMP gerados permitem que os resultados sejam aplicados a sistemas em maior escala, facilitando o desenvolvimento e a otimização de processos de DA (JINGURA and KAMUSOKO, 2017).

O modelo ADM1 pode ser adaptado a casos individuais. Existem certos fatores no ADM1 que requerem a discricionarietà do usuário, como a fracionamento da composição (Xc) e a definição de ingredientes inertes, solúveis (SI) e particulados (XI). No entanto, existem hipóteses que podem restringir a aplicabilidade do modelo em ambientes anóxicos. Por exemplo, o substrato composto particulado influente e o produto de citólise utilizam o mesmo componente Xc, o que requer um processo de desintegração antes da hidrólise. Portanto, caracterizar o lodo influente torna-se particularmente desafiador.

3.11 Saída combinada do modelo AR-BMP e comparação com ensaio BMP: estimativa da composição do efluente, produção de biogás e parâmetros operacionais do reator anaeróbio em escala real

A metodologia desenvolvida neste estudo envolveu o uso de dois modelos acoplados ADM1 para validar o processo completo de DA, incluindo o biorreator original, e inferir

parâmetros adicionais dos ensaios BMP. O primeiro modelo simula um reator contínuo agitado (CSTR), e o segundo modelo simula o ensaio BMP, que é um reator em batelada.

A entrada do segundo modelo é fornecida pela saída do primeiro modelo, e os parâmetros de entrada do primeiro modelo são obtidos por meio de um método de otimização iterativo que minimiza o erro da curva de produção de metano obtida juntamente com a DQO no início do ensaio BMP, conforme visto na Figura 35. Portanto, a metodologia proposta, usando o modelo ADM1 combinado, resolve o desafiador problema de caracterizar de forma sistemática o lodo influente.

Essa metodologia pode ser aplicada para apoiar o desenvolvimento de experimentos e projetos de reatores em escala real. A viabilidade em utilizar o modelo como uma ferramenta para prever os resultados dos ensaios BMP e reduzir possíveis desconfiâncias nos resultados experimentais podem ser ainda mais acurada ao comparar a diminuição da DQO observada experimentalmente em escala de bancada com os valores obtidos na simulação numérica.

Além disso, a atividade metanogênica e a curva de produção de biogás podem ser comparadas e calibradas para validar o modelo.

3.12 Otimização dos parâmetros operacionais utilizando o modelo AR-BMP combinado calibrado com ensaios BMP

Uma vez que o simulador AR-BMP está calibrado, este pode ser utilizado para otimizar os parâmetros operacionais do sistema AR. Como a implementação da linguagem Julia do modelo ADM1 DAE BSM2 desenvolvida neste trabalho é muito rápida, quando comparada às implementações anteriores, ela é muito adequada para fins de otimização.

Para demonstrar as capacidades da metodologia, apresenta-se um exemplo da otimização dos parâmetros operacionais do AR. Neste exemplo, é analisada a influência dos parâmetros tempo de residência de solutos e tempo de residência de partículas. O tempo de residência pode ser aumentado melhorando os padrões de fluxo no AR com uma mistura inadequada, reduzindo as regiões de fluxo de recirculação lenta ou zonas mortas e o tempo morto. Por outro lado, o tempo de residência de partículas pode ser aumentado seletivamente fornecendo uma região de baixa mistura na região de saída, permitindo a segregação de partículas devido à velocidade de sedimentação.

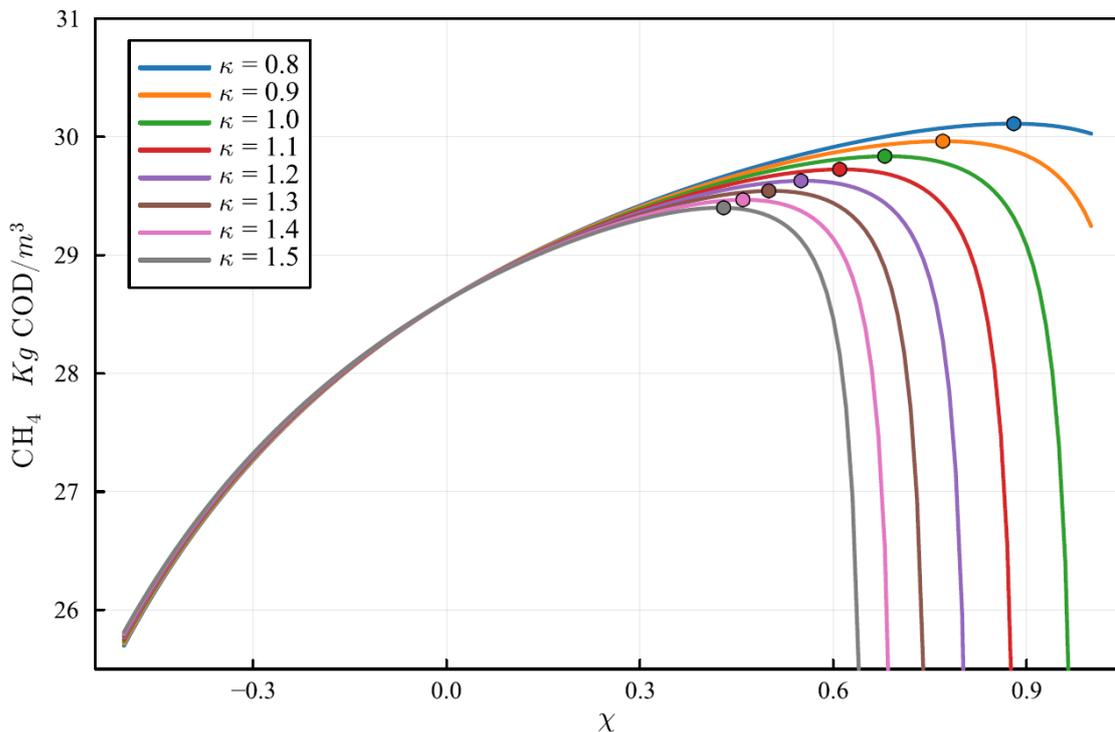
Para realizar um estudo de otimização, definimos os seguintes parâmetros:

$$\chi = \frac{V_p}{V} - 1 \quad (\text{Equação 11})$$

$$\kappa = \frac{V - V_s}{V_p - V} \quad (\text{Equação 12})$$

onde V , V_p , V_s são o volume nominal efetivo do reator, o volume efetivo de partículas e o volume efetivo de solutos, respectivamente. Os resultados das simulações usando o modelo calibrado para vários valores de χ e κ são mostrados na Figura 53.

Figura 53. A otimização da curva de produção de CH_4 , considerando um modelo simples de mistura/estratificação



Legenda: A produção ideal para o caso de $\kappa = 1.0$ é obtida para $\chi = 0.68$, e o valor de produção ideal é de 29.84 Kg COD/m³ de efluente. Os valores ótimos, para diferentes valores de κ , são marcados por um ponto em cada curva. Os dados relevantes são mostrados na Tabela 10.

Pode-se observar que a produção de CH_4 melhora, para todos os valores de κ , com o aumento de χ de 0 até um valor ótimo. A otimização fornece o melhor valor de χ para cada

valor do parâmetro κ , mantendo o mesmo volume nominal efetivo do reator V. A Tabela 21 mostra a produção de CH₄ no χ ótimo para cada um dos valores simulados de κ . Pode-se observar que a produção de CH₄ pode ser aumentada em mais de 5%, em relação aos valores de parâmetros não modificados, otimizando os valores de χ e κ .

Esta metodologia pode ser empregada, juntamente com simulações numéricas do fluxo de fluido particulado ou os resultados de modelos em escala devidamente reduzida, para avaliar os benefícios potenciais de uma melhoria proposta no processo.

Tabela 21. Otimização dos parâmetros de tempo de residência κ e χ para melhorar a produção de CH₄.

| κ | Optimal χ | CH ₄ produção | Incremento na produção (%) |
|----------|----------------|--------------------------|----------------------------|
| 0.8 | 0.88 | 30.11 | 5.23 |
| 0.9 | 0.77 | 29.96 | 4.71 |
| 1.0 | 0.68 | 29.83 | 4.26 |
| 1.1 | 0.61 | 29.73 | 3.88 |
| 1.2 | 0.55 | 29.63 | 3.54 |
| 1.3 | 0.50 | 29.54 | 3.24 |
| 1.4 | 0.46 | 29.47 | 2.98 |
| 1.5 | 0.43 | 29.4 | 2.74 |

3.13 Análise molecular 16S bactéria total e Archaea

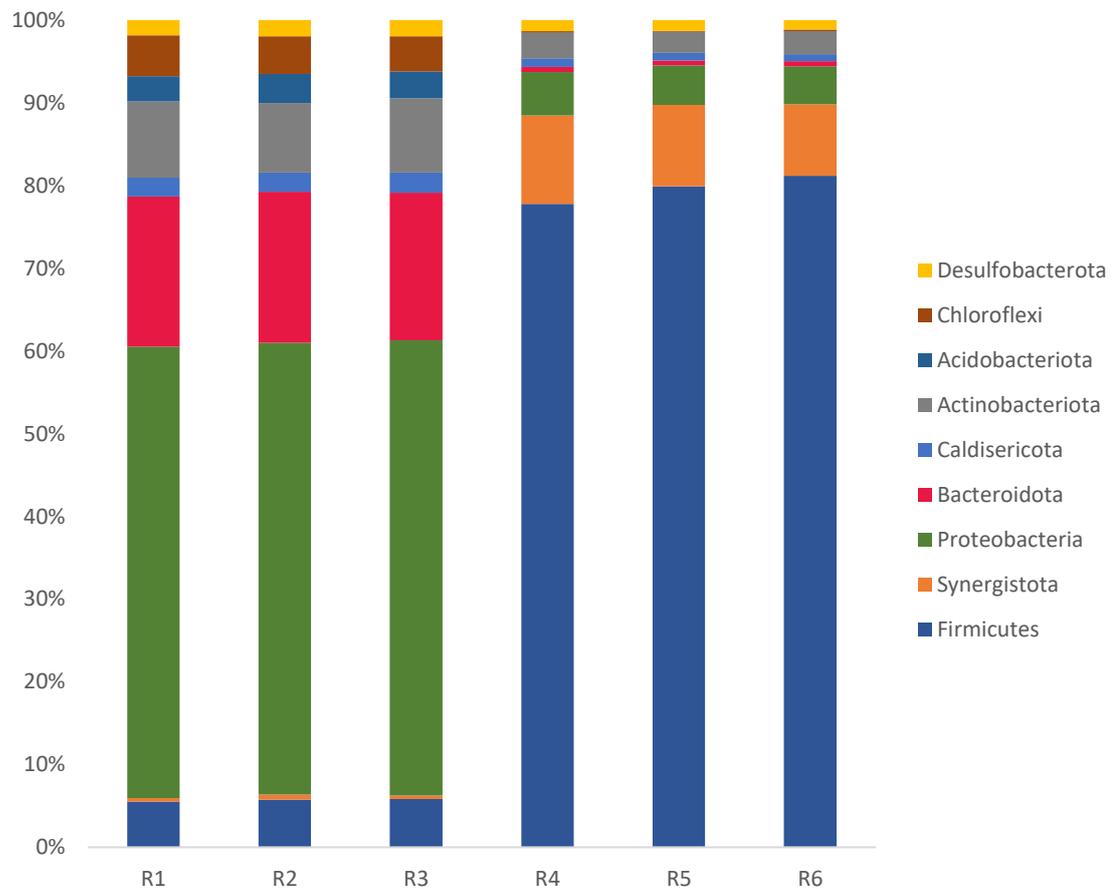
Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar a diversidade e estrutura da comunidade microbiana de LE de uma ETE, utilizando a ferramenta Illumina MiSeq para caracterizar a composição taxonômica de bactérias totais e arqueias provenientes da ETE-Alegria em antes e após o processo de DA em reatores BMP.

O perfil da comunidade bacteriana (Figuras 55 e 56) no BMP (R1-R6) apresentou variações na sua composição quando comparado o LE antes e após a DA, revelando que a estrutura microbiana nestes ensaios foi afetada.

Mudanças claras foram observadas na diversidade bacteriana após o ensaio BMP no laboratório. Os filos mais representados em número de OTUs no LE antes da DA foram: *Proteobacteria* (15248 OTU) > *Bacteroidetes* (4749 OTU) > *Actinobacteria* (2495 OTU) > *Firmicutes* (1619 OTU) > *Chloroflexi* (1183 OTU). Após a DA, a abundância relativa da comunidade bacteriana sofreu alterações, surgindo nova configuração de dominância entre os

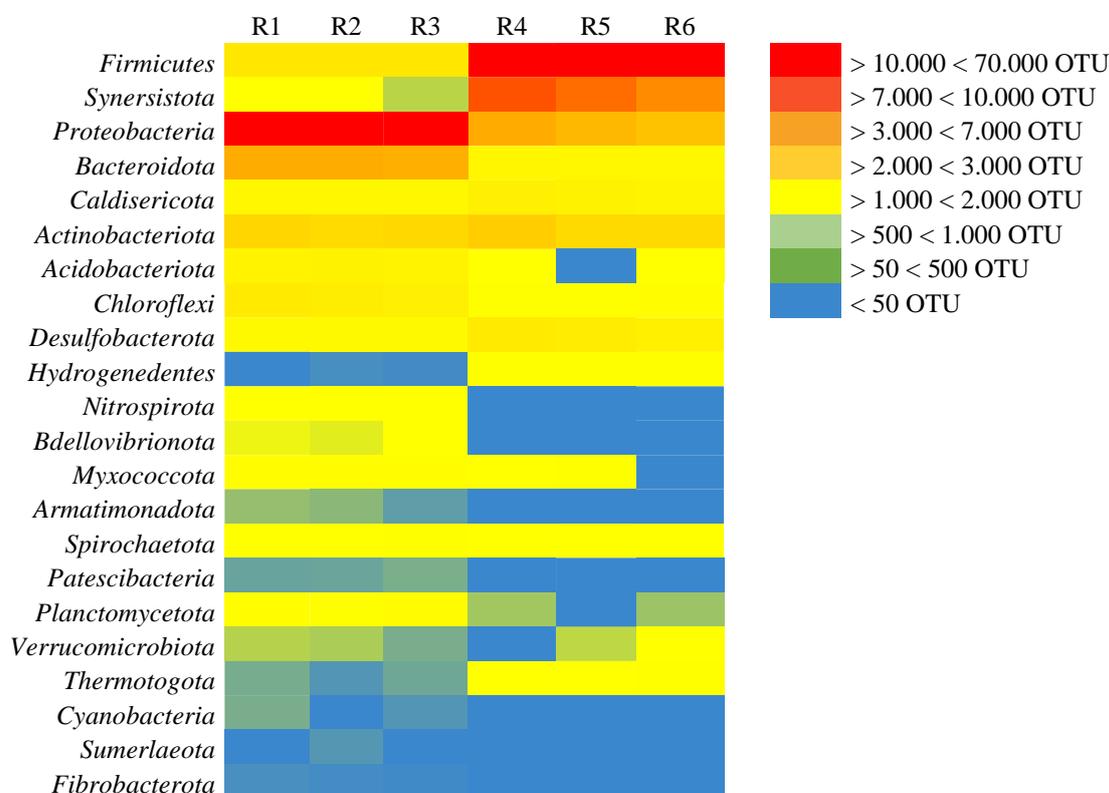
filos no sistema: *Firmicutes* (65368 OTU) > *Synergistota* (8182 OTU) > *Proteobacteria* (4010 OTU) > *Actinobacteriota* (2235 OTU) > *Desulfobacterota* (1077 OTU). Esta mudança é consistentemente relatada em vários estudos, sugerindo que há uma assinatura geral mantida na microbiota da DA em LE (ABENDROTH et al., 2015; GOUX et al., 2015; TREU et al., 2018; GAO et al. al., 2022).

Figura 55. Abundância relativa da comunidade microbiana



Legenda: Antes da DA (R1, R2 e R3: *Proteobacteria* (52.48% - 66.07%), *Bacteroidetes* (17.20% - 21.77%), *Actinobacteria* (8.63% - 11.11%), *Firmicutes* (5.54% - 6.72%), *Chloroflexi* (4.06% - 5.98%) e depois de 11 dias de DA (R4, R5 e R6: *Firmicutes* (54.26% - 78.41%), *Synergistota* (7.50% - 9.65%), *Proteobacteria* (3.65% - 4.74%), *Actinobacteriota* (2.51% - 2.68%), *Desulfobacterota* (1.60%).

Figura 56. Heatmap das variações do filo bacteriano



Legenda: R1, R2 e R3 (antes da DA): *Proteobacteria* (10667 - 15248 OTU), *Bacteroidetes* (3544 - 4943 OTU), *Actinobacteria* (1799 - 2495 OTU), *Firmicutes* (1082 - 1619 OTU), *Chloroflexi* (970 - 1183 OTU) R4, R5 e R6 (depois da DA) : *Firmicutes* (52648 OTU - 65368 OTU), *Synergistota* (6980 OTU - 8182 OTU), *Proteobacteria* (3530 OTU - 4010 OTU), *Actinobacteriota* (2103 OTU - 2235 OTU), *Desulfobacterota* (913 - 1077 OTU).

No processo da DA, as bactérias são os principais MO agentes hidrolisantes e acidulantes da matéria orgânica do LE, sendo vital investigar as mudanças na estrutura da comunidade bacteriana (SHENG et al., 2023). Em estudo realizado por Nascimento et al (2018), *Proteobacteria* e *Clostridium* foram o filo e o gênero dominante encontrado em uma ETE em São Paulo. MEERBERGEN et al. (2017) encontraram predominantemente *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* para lodos domésticos. As proteobactérias geralmente predominam no LE doméstico, correspondendo de 30 a 65% do total de sequências (LIANG et al., 2017; MEERBERGEN et al., 2017; ZHANG et al., 2020).

A microbiota bacteriana deste trabalho é semelhante a encontrada em resultados de estudos anteriores (FITAMO et al., 2017; SAHA et al., 2019; TAO et al 2020) em relação a alternância da dominância de *Proteobacteria* para *Firmicutes* pós DA.

Lauber et al. (2009) descobriram que a abundância relativa dos filos bacterianos (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *alfa*, *beta* e *gama-Proteobacteria*) não dependem da localização do lodo, mas sim do pH. Portanto, o pH pode modular a comunidade microbiana, controlando a disponibilidade de nutrientes e processos enzimáticos que são essenciais para o metabolismo microbiano (FIERER e JACKSON, 2006; MADIGAN et al., 2016). A estabilidade do pH dos digestores anaeróbios é um importante fator de controle no equilíbrio do sistema (ISSAH et al. 2020).

Yang et al (2016) estudaram LE de uma ETE na China e encontraram *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* e *Proteobacteria* representando os cinco filos bacterianos mais predominantes, correspondendo a 28,4%, 22,9%, 12,5%, 4,0% e 3,5% do total das sequências 16S de genes de rRNA, respectivamente.

Firmicutes, *Bacteroidota*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* *Proteobacteria* são as principais bactérias no LE das ETEs, sendo *Firmicutes* e *Bacteroidetes* as bactérias mais comuns em reatores de DA, afetando o grau de fermentação do substrato (SCHNEIDER et al., 2022; JIANG et al. al., 2021; TIAN et al., 2021; GAO et al., 2022; LIM et al., 2022).

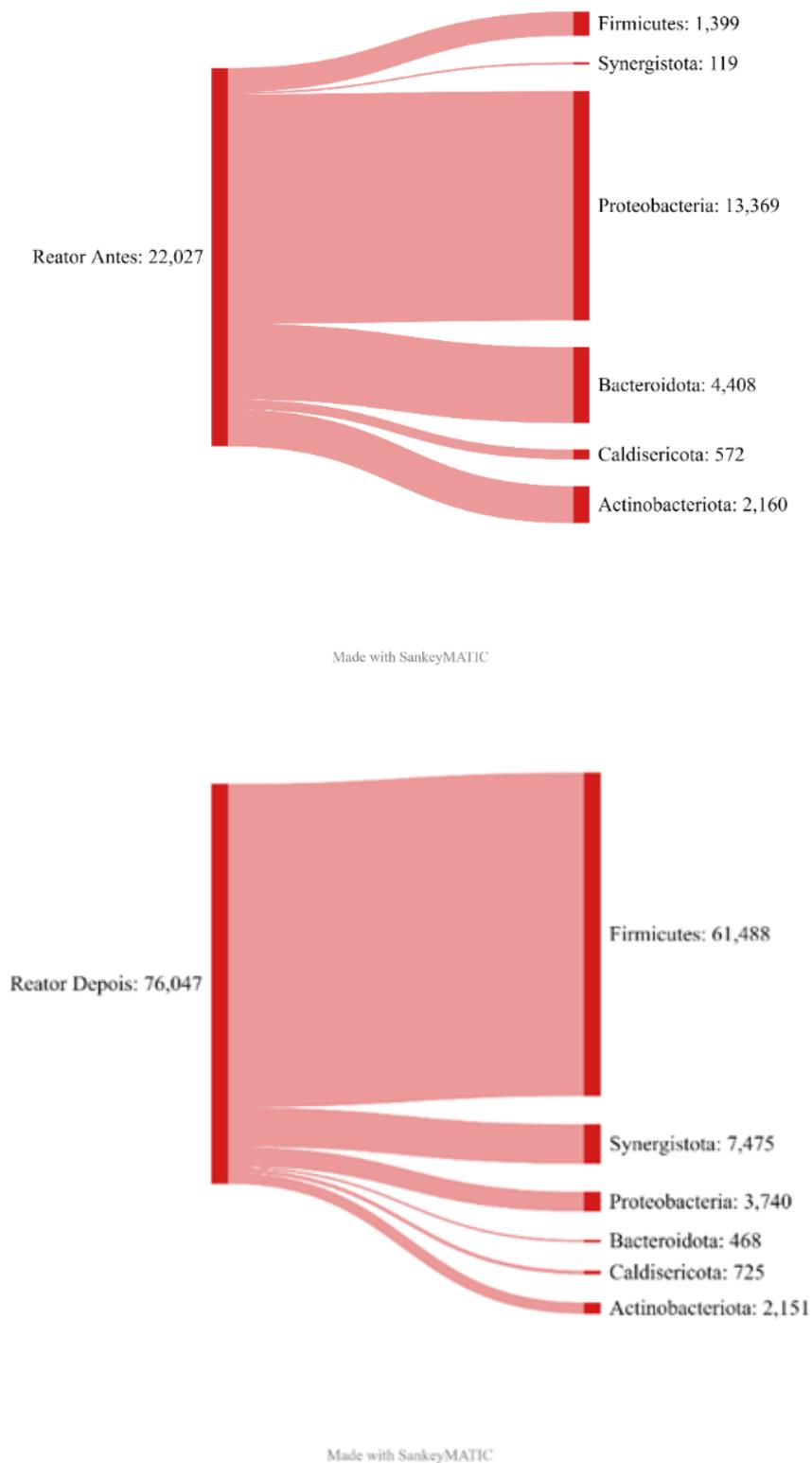
Outros filos, como *Chloroflexi* e *Spirochaeta*, também são citados em alguns estudos, o que corrobora o ambiente complexo associado ao LE, onde a diversidade microbiana se ajusta às características de cada tipo de reator, condições climáticas locais e parâmetros operacionais (LIM et al., 2022; SUNDBERG et al., 2013).

Bactérias do filo *Firmicutes* são amplamente distribuídas em sistemas anaeróbios de tratamento de lodo (KOWAL et al., 2021; YANG et al., 2014) e são versáteis na degradação de uma vasta gama de substratos ambientais (LIU et al., 2016). Podem atuar em vias metabólicas, associadas a processos hidrolíticos e acidogênicos (GRECES, 2020; LIU, 2016), são responsáveis pela produção de ácidos graxos voláteis, que podem ser utilizados por outros grupos microbianos (NASCIMENTO et al., 2018).

Observa-se a produção de celulasas, lipases, proteases e outras enzimas extracelulares que realizam a degradação de substratos (incluindo proteínas, lipídios, lignina, celulose, açúcares e aminoácidos) (LEVEN et al., 2007). Este grupo de bactérias fermentadoras é bem descrito, muitas vezes atuando como sintróficos para os organismos metanogênicos, degradando ácidos voláteis, como butirato e seus análogos (GARCIA-PEÑA et al. 2011).

A imagem 57 mostra o resultado para as análises RNAr 16S em OTUs dos experimentos BMP conduzidos no Laboratório de Ensaios Ambientais da UDT-Gesar/Uerj.

Figura 57. Resultado para as análises RNAr 16S em OTUs



As proteobactérias geralmente apresentam grande diversidade e capacidade metabólica, atuando em importantes funções ambientais como os ciclos de C, N, S e P (FRIEDRICH et al., 2005; MEYER et al., 2016). Sua abundância foi correlacionada com os teores de sólidos totais quando submetidos à anaerobiose (LIU et al., 2016). As proteobactérias têm uma ampla gama de papéis em todas as etapas da DA, exceto na metanogênese, e estão entre os principais contribuintes para a produção de todos os principais produtos de fermentação (CAI et al., 2016).

As classes Alfa e Gama-Proteobacteria foram as mais representativas neste estudo em termos de diversidade de gêneros, com 30 e 27 diferentes tipos, respectivamente.

Bactérias do filo *Bacteroidetes* participam da hidrólise e fermentação devido à maior abundância dos carboidratos iniciais da DA. Este grupo é mais conhecido por desempenhar vários papéis na DA, que foram relatados como fermentadores de açúcar e degradadores de celulose vegetal (YANG et al., 2016). A degradação de proteínas e a fermentação de aminoácidos em acetato e propionato entre as cepas também foram documentadas (KAMPMANNA et al., 2012).

Existe relato de que *Synergistes* utiliza aminoácidos e, por sua vez, fornece ácidos graxos de cadeia curta ou atua como oxidante de acetato sintrófico (RIVIÈRE et al. 2019).

Relativamente pouco se sabe sobre a ecologia de *Chloroflexi* em ETEs de redução de nutrientes (NIERYCHLO et al, 2019). Estudos in situ revelam uma preferência pela absorção de açúcares, e um elevado nível de enzimas hidrolíticas associadas à superfície indica o seu envolvimento na degradação de compostos orgânicos complexos (KRAGELUND et al, 2007).

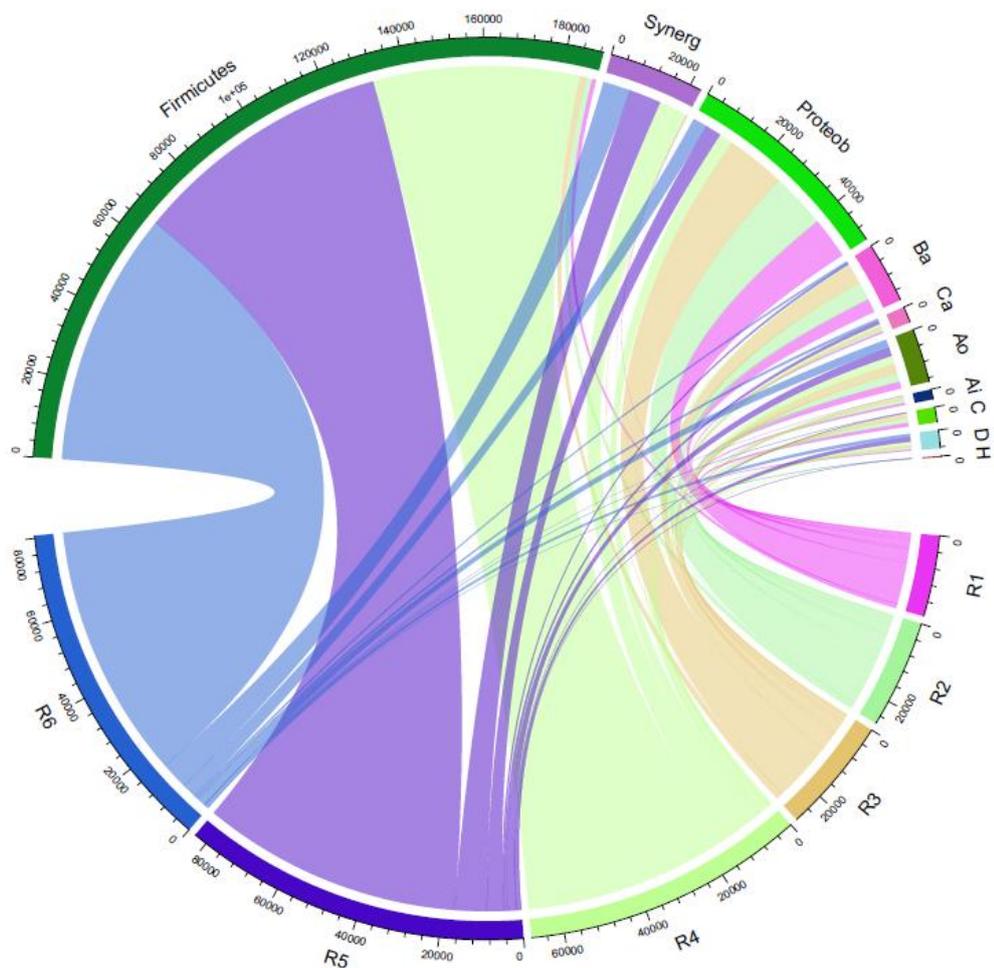
O filo *Desulfobacterota* tem papel importante no ciclo do enxofre em ambientes anaeróbios. Evidências mostram que podem reduzir S para a produção de energia (SUN et al, 2023).

Hydrogenedentes é um filo de bactérias recentemente proposto, anteriormente conhecido como NKB19. Análises genéticas das sequências extraídas sugerem que esses MO desempenham um papel importante na degradação de glicerol e lipídios na biomassa detritica (NOBU et al., 2015). A reconstrução metabólica sugere uma capacidade metabólica versátil, incluindo possível redução de nitrogênio, oxidação de sulfito, redução de sulfato e homoacetogênese. Este primeiro vislumbre das capacidades metabólicas dessas bactérias cosmopolitas sugere que elas estão envolvidas em processos geoquímicos chave, incluindo ciclos de enxofre, nitrogênio e carbono, e que estão adaptadas para sobreviver na biosfera escura, muitas vezes anóxica, subsuperficial (MOMPER et al., 2018).

Ao analisar o diagrama de cordas (Fig. 58), os insights sobre as conexões e padrões entre as entidades/categorias, identificam uma forte conexão entre *Firmicutes* e *Synergistes*

relacionados ao processo da DA (R4, R5 e R6), também pode ser observada uma maior variedade de filos bacterianos (R1, R2 e R3). Verifica-se o aumento significativo da abundância relativa referente ao filo *Firmicutes* pós DA (R4 – R6), como também, maior biodiversidade em relação aos filos em R1, R2 e R3.

Figura 58. Diagrama de cordas do filo bacteriano



Legenda: Diagrama de cordas do filo bacteriano relacionado a R1, R2 e R3 (antes da DA) e R4, R5 e R6 (após DA). Os 10 grupos com os filos mais representativos: *Firmicutes*, Synergy: *Synergistota*, Proteob: *Proteobacteria*, Ba: *Bacteroidetes*, Ca: *Caldisericota*, Ao: *Actinobacteria*, Ai: *Acidobacteria*, C: *Chloroflexi*, D: *Desulfobacterota* e H: *Hydrogenedentes*.

Diversidade microbiana: gênero

A nível de gênero os grupos mais representativos ao final da DA foram *Sporanaerobacter* (36689 OTU) seguido por *Clostridium* (20451 OTU), ambos da classe *Clostridia*, JGI-0000079-D21 (2785 OTU) e *Aminiphilus* de (2380 OTU) da classe *Synergistia*, CI75cm.2.12 da Família *Nitrosococcaceae* e Classe γ -*Proteobacteria* (2619 OTU), *Rhabdanaerobium* (2514 OTU), *Caldicoprobacter* (1839 OTU) e *Romboutsia* (1638 OTU) da Classe *Clostridia*, Syner-01 (1237 OTU) da Classe *Synergistia*, *Gordonia* 1133 da Classe *Actinobacteria*.

A abundância relativa da comunidade microbiana por gênero (Figs. 59 e 60) antes da DA (R1, R2, R3): após a DA (R4, R5, R6): *Sporanaerobacter* (43% - 47%), *Clostridium* (19%), JGI-0000079-D21 (3,4% - 4,1%), *Aminiphilus* (2,9% - 3,7%), CI75cm.2,12 (3,13% - 3,55%), *Rhabdanaerobium* (3,1% - 3,62%), *Caldicoprobacter* (1,9% - 2,27%), *Romboutsia* (1,5% - 1,95%), Syner-01 (1,3% - 1,6%), *Gordonia* (1,3% - 1,6%).

A abundância em todos esses grupos aumentou significativamente com o processo de DA, já que alguns deles no processo inicial eram <100 OTU como *Sporanaerobacter*, *Clostridium*, JGI-0000079-D21, *Aminiphilus*, CI75cm.2.12, *Rhabdanaerobium*, *Caldicoprobacter* e Syner-01. *Romboutsia* e *Gordonia* apresentaram OTU >100<200).

Os gêneros mais abundantes no início da operação foram *Ottowia* (2851 OTU), *Candidatus Competibacter* (1933 OTU), Ellin6067 (1480) ambos da Classe γ -*Proteobacteria*, *Defluviicoccus* (1379 OTU) da Classe α -*Proteobacteria*, OLB8 (1271 OTU) da Classe *Bacteroidia*.

Espera-se mudanças entre as comunidades, pois qualquer uma delas conta com funções específicas devido a cada etapa da DA. *Sporanaerobacter* é um fermentador de glicose liberando acetato, H₂ e CO₂ como os principais produtos finais do metabolismo e pode utilizar enxofre elementar, tiosulfato, sulfito, nitrato ou nitrito como aceptor de elétrons em metabolismos anaeróbios não fermentativos (HERNANDEZ-EUGENIO et al., 2002).

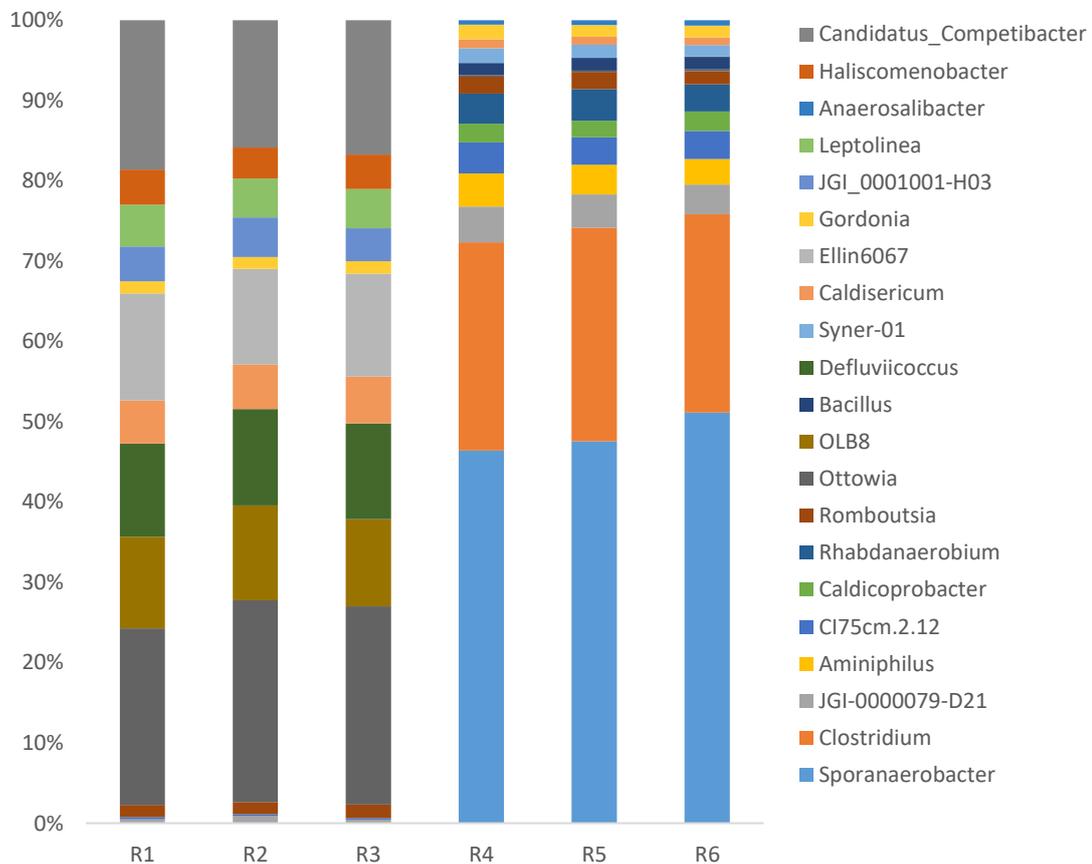
O gênero *Clostridium* está relacionado à hidrólise de polímeros complexos (Yang et al., 2016) e os subprodutos liberados podem fornecer as substâncias para a rápida colonização dessas bactérias do filo *Firmicutes*. *Clostridium* pertence ao grupo das bactérias Gram-positivas e é responsável pela degradação de compostos orgânicos estando relacionado à hidrólise de biopolímeros complexos (ZHAO et al., 2019).

A alta abundância de *Clostridium* em lodos domésticos é esperada, uma vez que representa 10-40% da microbiota intestinal humana (MANSON et al., 2008; LOPETUSO et al., 2013). *Clostridium* é geralmente o gênero mais abundante em lodos de ETEs (Aida et al.,

2015). Foi considerada a principal classe, respondendo por $95,5 \pm 2,32\%$ das leituras de Firmicutes em estudos conduzidos por WALTER et al. (2018).

Aminiphilus é um gênero estritamente anaeróbico e mesofílico. Este gênero utiliza compostos peptídicos, aminoácidos, malato, fumarato, glicerol e piruvato fermentando então em acetato, propionato e pequenas quantidades de ácidos graxos de cadeia ramificada. Carboidratos não são utilizados por este grupo (DÍAZ et al., 2007).

Figura 59. Abundância relativa da comunidade microbiana por gênero

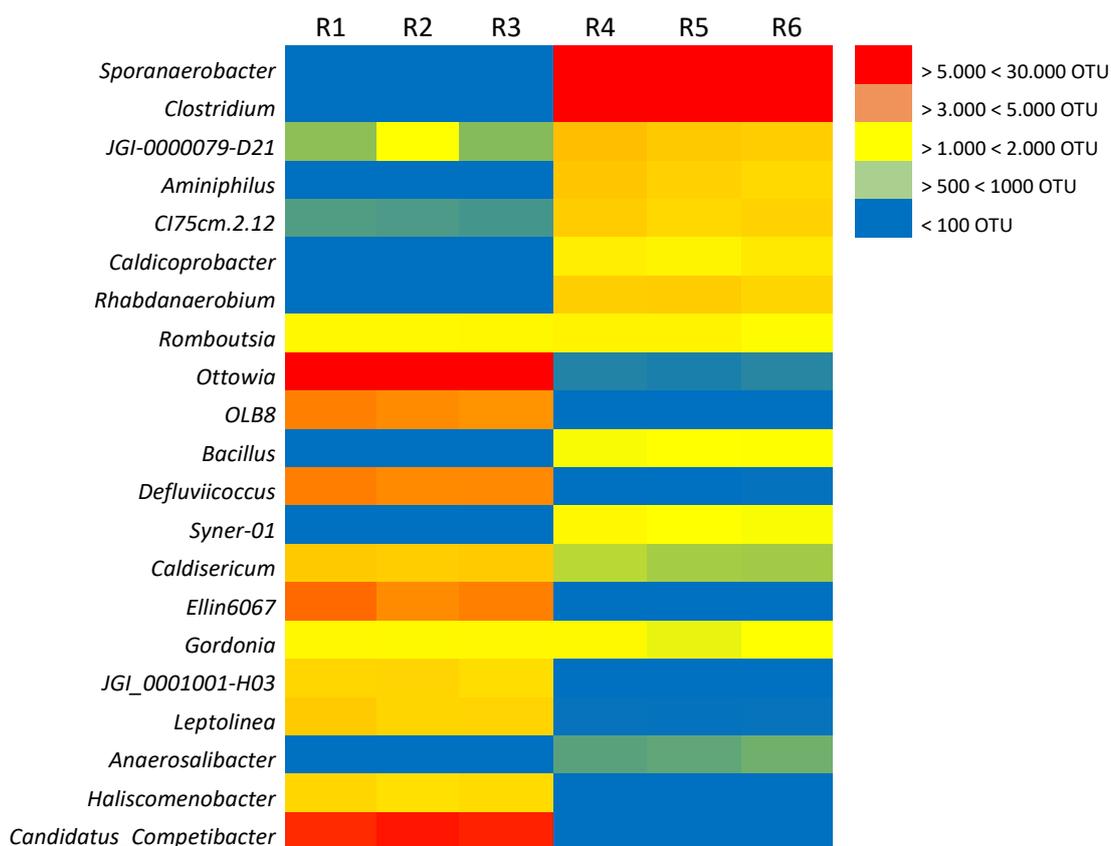


Legenda: Abundância relativa da comunidade microbiana por gênero antes da DA (R1, R2, R3): após a DA (R4, R5, R6): Sporanaerobacter (43% - 47%), Clostridium (19%), JGI-0000079-D21 (3,4% - 4,1%), Aminiphilus (2,9% - 3,7%), CI75cm.2,12 (3,13% - 3,55%), Rhabdanaerobium (3,1% - 3,62%), Caldicoprobacter (1,9% - 2,27%), Romboutsia (1,5% - 1,95%), Syner-01 (1,3% - 1,6%), Gordonia (1,3% - 1,6%).

Defluviicoccus é descrito como acumulador de glicogênio e síntese anaeróbica de polihidroxialcanoato (PHA). Os PHAs funcionam como uma reserva energética para a célula e tem alto valor biotecnológico agregado, pois este polímero tem propriedade que permitem que seja utilizado como um plastificante, com inúmeras aplicações econômicas sustentáveis (BESSARAB et al., 2022).

Além da competição por recursos e espaço entre as espécies, o funcionamento do ecossistema não depende diretamente da estrutura geral da comunidade em termos de diversidade (BRIONES & RASKIN 2003). De fato, a uniformidade da comunidade (WITTEBOLLE et al. 2009) e a dinâmica adequada de uma comunidade bacteriana ou flexibilidade para se adaptar às mudanças nas condições ambientais (MIURA et al. 2007) são mais importantes para garantir o desempenho estável do reator (WALTER et al., 2018).

Figura 60. *Heatmap* do gênero microbiano por OTU



Legenda: (R1, R2, R3): após AD (R4, R5, R6): *Sporanaerobacter* (29013 - 36689 OTU), *Clostridium* (16208 - 20451 OTU), JGI-0000079-D21 (2785 - 3166 OTU), *Aminiphilus* (2380 - 2874 OTU), CI75cm.2.12 (2421 - 2619 OTU), *Rhabdanaerobium* (2356 - 3035 OTU),

Caldicoprobacter (1454 - 1839 OTU), *Romboutsia* (1244 - 1638 OTU), *Syner-01* (1081 - 1237 OTU), *Gordonia* (1102 - 1133 OTU).

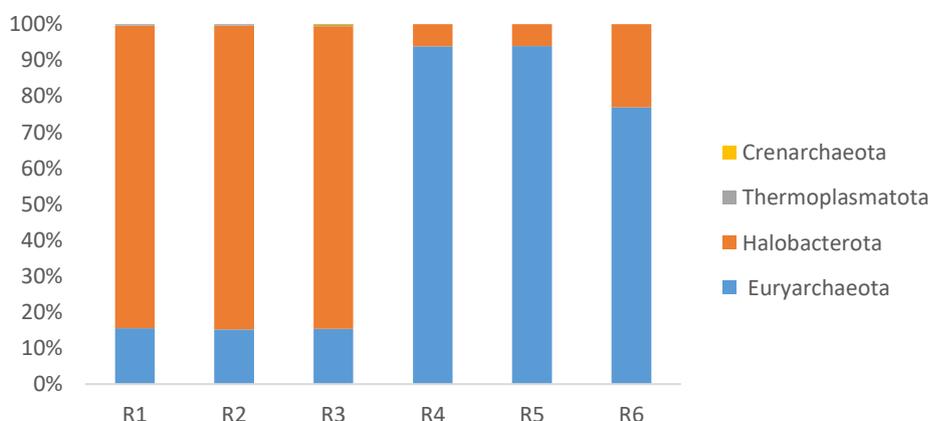
Muitos grupos bacterianos são capazes de degradar uma ampla gama de macromoléculas, como celulose, pectina, quitina, proteínas e vários compostos xenobióticos, e assim podem reagir rapidamente a mudanças de substrato (CHOUARI et al. 2003). Os grupos generalistas podem desempenhar funções ecológicas semelhantes em um sistema e essa redundância garante que mesmo com mudanças das condições ambientais, o ecossistema permaneça funcional, pois seus nichos funcionais estão ocupados (LOUCA et al, 2018).

Comunidade de Archaea

Em termos de abundância relativa, a comunidade metanogênica geralmente representa uma parte minoritária (2-5%) da comunidade total, mas os metanogênicos têm sido observados como apresentando alta atividade em relação à sua abundância (CAI et al, 2019).

A comunidade de archaea mais representativa para filo foi expressa em termos de abundância relativa (Fig. 61) por *Euryarchaeota* (15% antes da DA e 76% a 95% após a DA) e *Halobacterota* (82% e 12%, antes e pós a DA, respectivamente). Havendo significativa mudança na dominância desses dois grupos durante a DA. O filo *Thermoplasmata* (2% antes da DA) e *Crenarchaeota* (1% antes da DA) corresponderam a minoria no início do experimento e sem detecção desses grupos ao final do processo.

Figura 61. Abundância relativa da comunidade metanogênica: Filo

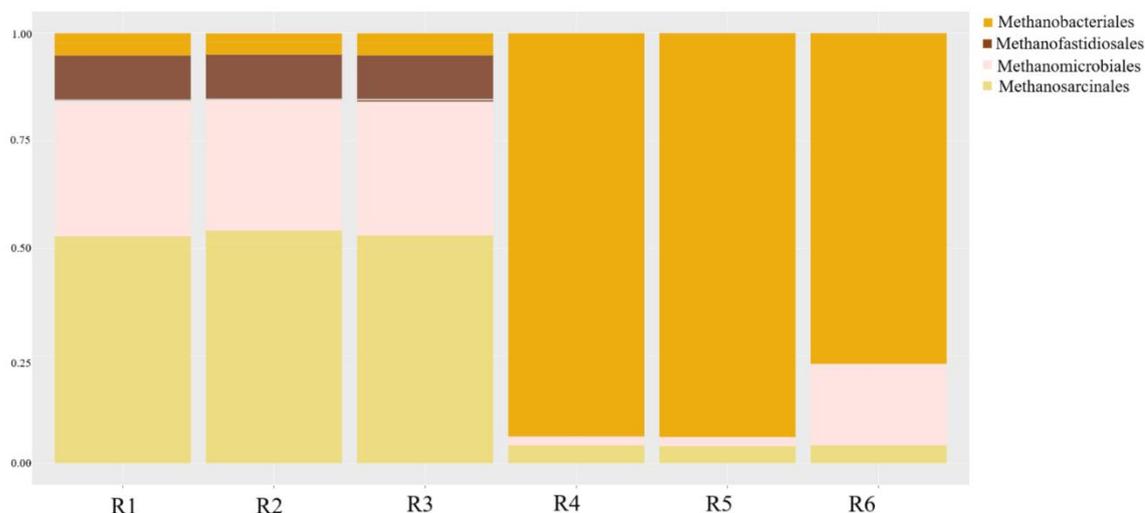


Legenda: Euryarchaeota (15% antes da AD e 76,94 a 93,96% após a AD), Halobacterota (84% antes da AD e 6 a 23% após a AD), Thermoplasmata e Crenarchaeota (0,4%, 0,2%, respectivamente, sem detecção após DA).

As ordens *Methanosarcinales* (50%), (30%), *Methanofastidiosales* (15%) e *Methanobacteriales* (5%) antes da DA foram substituídas por *Methanobacteriales* (80%), *Methanomicrobiales* (15%) e *Methanosarcinales* (5%) pós DA (Fig. 62).

Metanogênicos comumente detectados em biodigestores de biogás pertencem às ordens *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* (filo *Euryarchaeota*) (HAILU et al, 2021).

Figura 62. Abundância relativa da comunidade metanogênica: Ordem



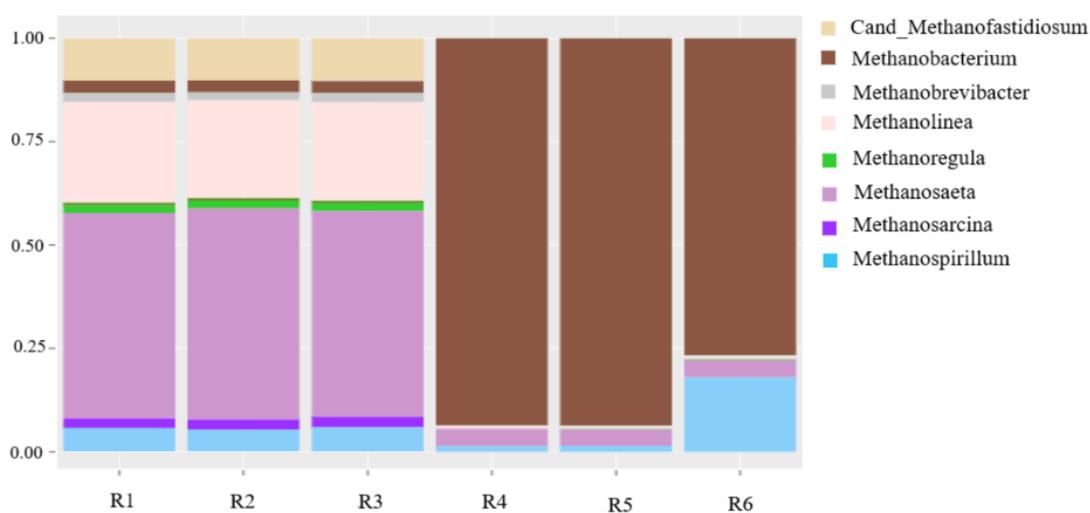
Legenda: Antes da DA - *Methanosarcinales* (50%), *Methanomicrobiales* (30%), *Methanofastidiosales* (15%) e *Methanobacteriales* (5%) foram substituídas por *Methanobacteriales* (80%), *Methanomicrobiales* (15%) e *Methanosarcinales* (5%) pós DA.

A nível de gênero, a dominância de grupos metanogênicos foi representada por *Methanosaeta* (34497 OTU) > *Methanelinea* (16261 OTU) > *Methanofastidiosum* (6836 OTU) > *Methanospirillum* (3739 OTU) > *Methanosarcina* (1521 OTU) > *Methanobrevibacter* (1422 OTU) antes da DA e *Methanobacterium* (62398 OTU) > *Methanosaeta* (2617 OTU) > *Methanospirillum* (2221 OTU) após a DA (Figuras 63 e 64).

Essa mudança na conformação da comunidade de arqueias sugere também uma mudança na rota metabólica de produção de metano, grupos de metabolismo predominantemente acetoclásticos foram substituídos por grupos hidrogenotróficos.

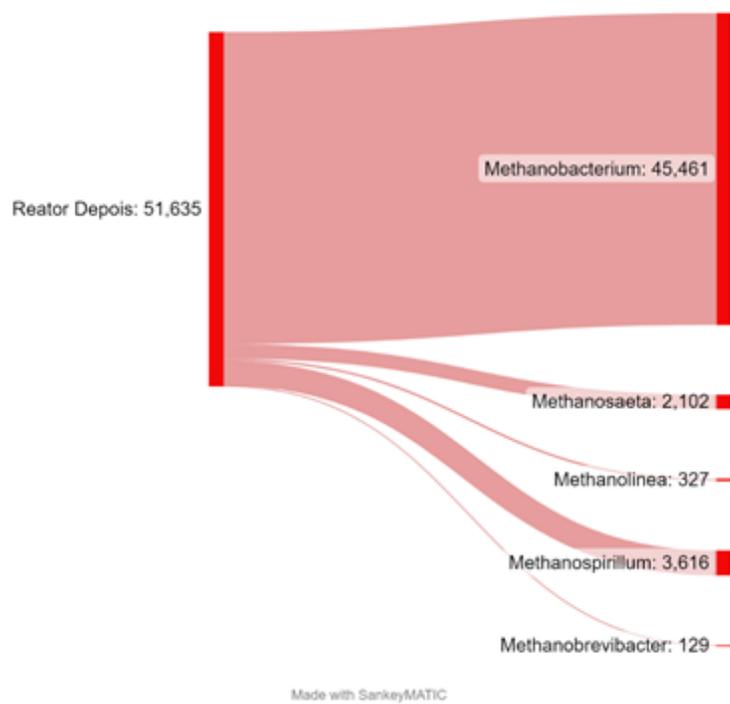
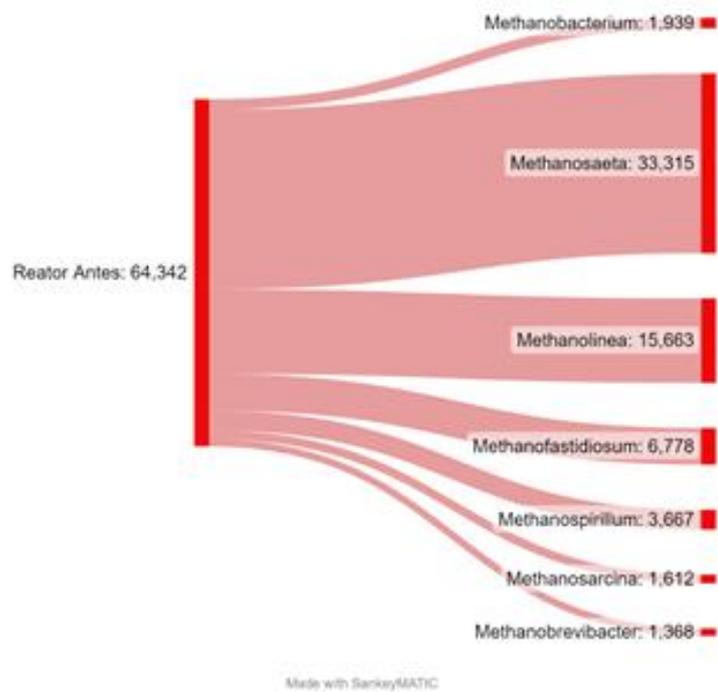
A mudança de uma rota de DA acetoclástica dominante no início da operação para hidrogenotrófica ao final do experimento já foi observada em outros estudos (CAI et al., 2022; PAN et al., 2021).

Figura 63. Abundância relativa da comunidade metanogênica: gênero



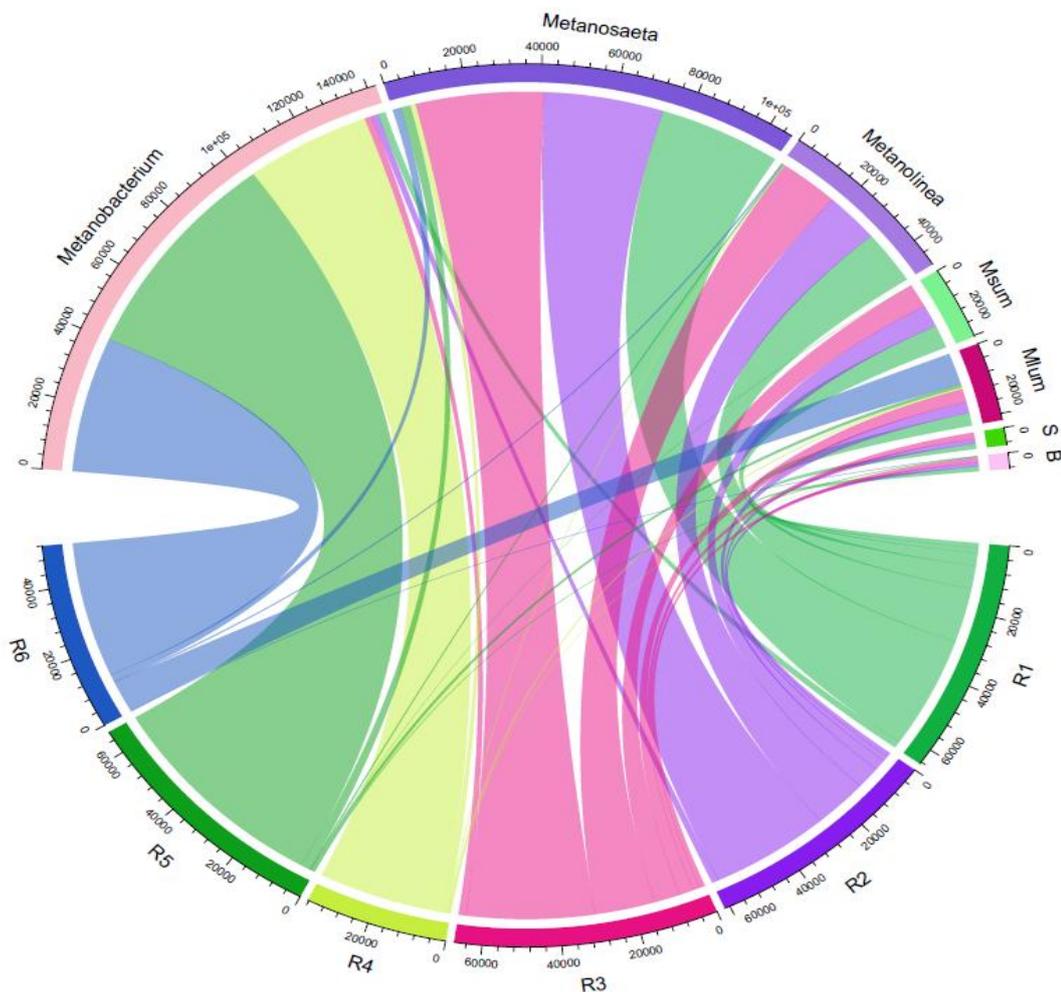
Legenda: R1 - R3: Methanosaeta (43.12% - 54.52%), Methanolinea (19.68% - 25.71%), Methanofastidiosum (8.64% - 11.11%), Methanospirillum (4.37% - 6.30%), Methanosarcina (2.05% - 2.82%), Methanobrevibacter (1.62% - 2.32%). R4 - R6: Methanobacterium (76.51% - 93.71%) > Methanosaeta (3.93% - 4.17%) > Methanospirillum (1.46% - 17.95%).

Figura 64. Reator antes e depois DA: gênero metanogênicas



Os resultados do diagrama de cordas (Fig. 65) permite inferir as conexões e padrões entre o aumento significativo da abundância relativa do gênero *Methanobacterium* nos reatores (R4 - R6) e também a dominância deste grupo sobre *Methanosaeta*, *Methanolinea* e *Methanosarcina*. A grande variedade de filos arqueais (*Methanofastidiosum*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*, *Methanolinea*) coexistindo nos reatores (R1-R3). Houve incremento na abundância relativa do gênero *Methanobacterium* e redução na biodiversidade dos gêneros.

Figura 65. Diagrama de Cordas relacionado à comunidade metanogênica no nível de gênero



Legenda: R1, R2 e R3 (DA) e R4, R5 e R6 (após DA). Os grupos mais representativos: *Methanobacterium*; *Methanosaeta*; *Methanolinea*; Msum: *Methanofastidiosum*; Mlum: *Methanospirillum*; S: *Methanosarcina* e B: *Methanobrevibacter*.

Methanosaeta é um MO metanogênico acetoclástico obrigatório, o qual produz CH₄ utilizando o acetato (PAN et al. 2016; CONKLIN et al. 2006).

Methanosarcina é um gênero versátil que pode utilizar acetato, metilaminas, metanol, como também H₂/CO₂ para o processo de metanogênese (ZHANG et al. 2021) e mantém sua robustez mesmo quando as concentrações de amônia ou sal são altas ou quando as condições operacionais (por exemplo, temperatura) flutuam.

No presente estudo, o gênero *Methanosarcina* não apresentou crescimento significativo, não podendo, inclusive ser detectado após a DA. É intrigante que não seja um gênero predominante de metanogênicos na maioria dos biorreatores de DA (LIM et al. 2022).

No presente estudo, o gênero hidrogenotrófico *Methanobacterium* apresentou um aumento significativo em abundância no reator, seguido por *Methanosaeta*, um grupo acetoclástico, como o segundo grupo mais abundante (Fig. 65). Mudanças semelhantes nos metanogênicos dominantes de *Methanosaeta* para *Methanobacterium* e *Methanosarcina* foram observadas em outros estudos de DA em LE (CAI et al. 2022; ZHANG et al. 2019).

Esta mudança na diversidade da comunidade microbiana também pode resultar em uma mudança na via metabólica de produção de CH₄, da via acetoclástica para a via hidrogenotrófica, conforme observado em outros estudos (CAI et al. 2022; PAN et al. 2021).

Methanosaeta é um gênero versátil que pode utilizar acetato, metanol e H₂/CO₂ para metanogênese (ZHANG et al., 2012), mas é preferencialmente acetoclástico.

O gênero *Methanobacterium*, um grupo hidrogenotrófico, teve um aumento significativo no reator, tornando-se o mais abundante seguido por *Methanosaeta*. Isso foi observado em outros estudos de LE em relação às archaea metanogênicas (ZHANG et al., 2019, HAGEN et al., 2017).

Populações acetoclásticas apresentam maior grau de inibição do que hidrogenotróficas em termos de taxa de utilização de substrato, taxa de crescimento e rendimento celular (PALATSI et al., 2010; YANG et al., 2016). A mudança na rota metabólica pode estar relacionada ao fato de que o aumento de *Firmicutes*, especialmente a população de *Clostridia*, que contém bactérias oxidantes de acetato que convertem acetato em hidrogênio, incluindo aquelas entre metanogênicos hidrogenotróficos como *Methanobacterium* sequestrantes de hidrogênio.

Estudos sobre a biocenose microbiana de usinas de biogás forneceram evidências de que os metanogênicos hidrogenotróficos desempenham um papel importante no processo de degradação de recursos renováveis (MAUS et al., 2013) e a atividade dos metanogênicos

hidrogenotróficos é crucial para um desempenho estável e eficiente do processo (DEMIREL e SCHERER, 2008).

Correlações positivas entre metanogênicos hidrogenotróficos e populações de *Clostridia* foram observadas em biorreatores DA em grande escala (ZHANG et al., 2019). Ruiz-Sanchez et al (2019) também relataram um aumento da predominância de gêneros que contêm bactérias sintróficas (*Clostridium* e *Bacteroides*) e mudança de metanogênicos da rota acetoclástica para hidrogenotrófica na DA.

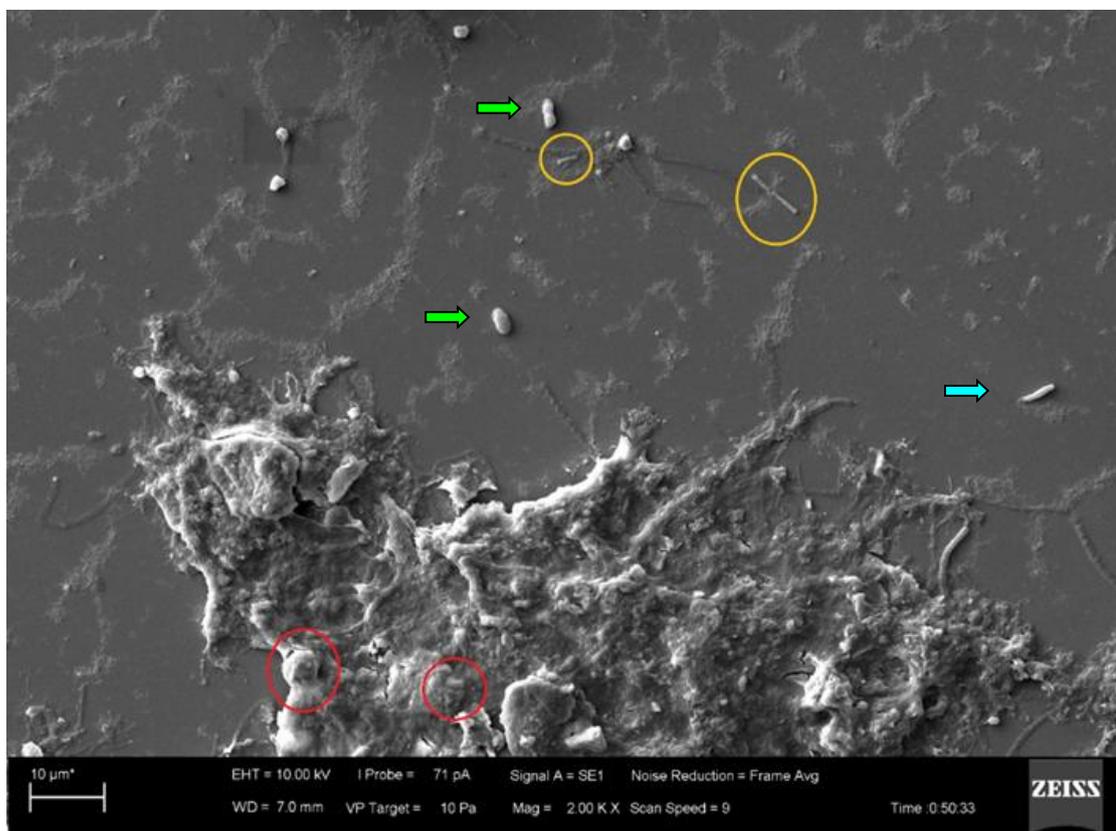
3.14 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 66 mostra imagem sugestiva para *Methanosarcina* (circulado em vermelho) e *Methanosaeta* (circulado em amarelo).

As células individuais de *Methanosaeta* são relativamente alongadas, com um diâmetro uniforme ao longo do filamento. As dimensões celulares específicas podem variar dependendo das condições ambientais, nutrientes disponíveis e substratos presentes no sistema anaeróbico.

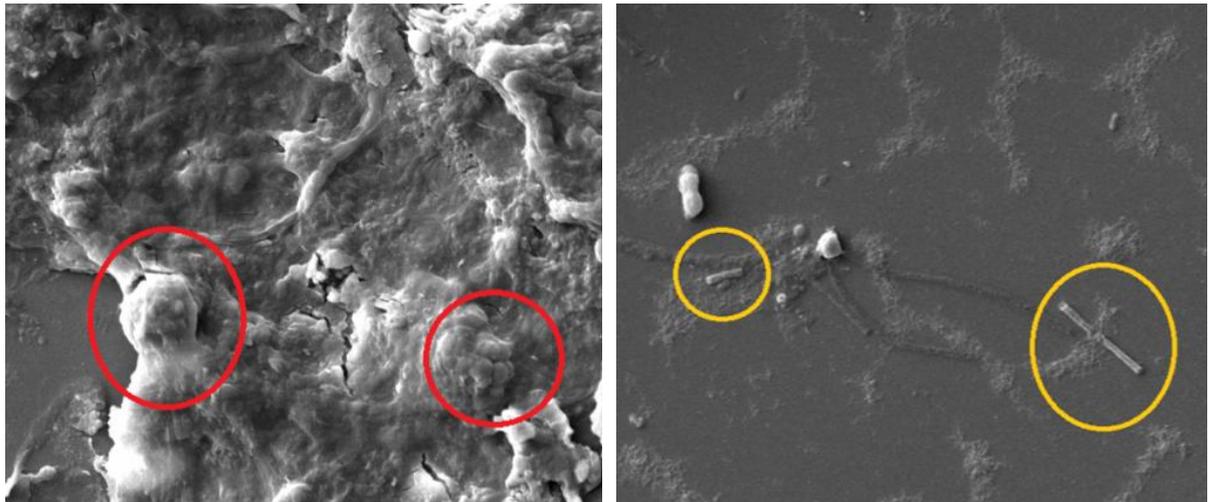
Sugestivo de *Proteobacteria* indicado com seta verde e sugestivo de *Bacteroidota* com seta azul (Figura 66).

Figura 69. MEV do LE da ETE-Alegria



A capacidade de ajustar suas dimensões celulares destaca a adaptabilidade de *Methanosaeta* a diferentes ambientes anaeróbios. Uma das características marcantes de *Methanosaeta* é sua forma filamentosa. A Figura 67a mostra imagem sugestiva para *Methanosarcina* circulado em vermelho e *Methanosaeta* circulado em amarelo (Fig. 67b).

Figura 67. Microscopia eletrônica de varredura



a

b

Legenda: (a) *Methanosarcina* circulado em vermelho; (b) *Methanosaeta* circulado em amarelo

As células de *Methanosarcina* podem se agrupar em arranjos cocoides e formar cadeias/cachos. As células de *Methanosarcina* podem ocorrer isoladamente ou em arranjos de grupos, tais como em pares, tetrápodes ou cadeias.

Proteobacteria e arqueias metanogênicas, como *Methanosaeta*, podem coexistir em ambientes anaeróbios.

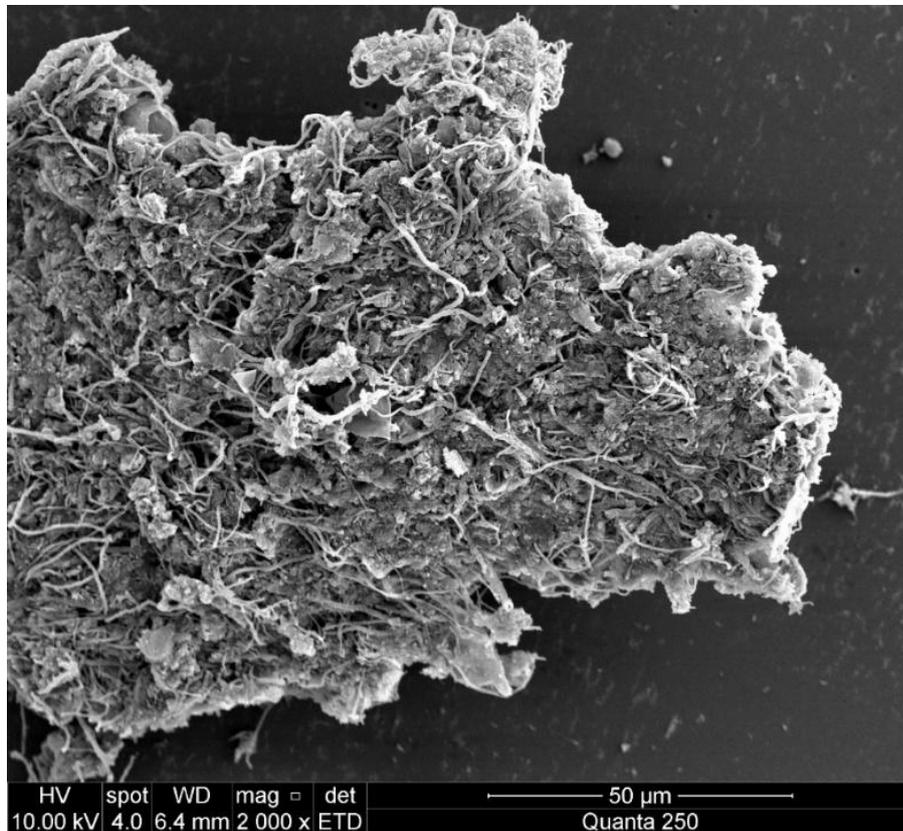
As interações entre os grupos microbianos mencionados acima, desempenham papéis cruciais nos ciclos biogeoquímicos, como o ciclo do carbono, ao influenciar a transformação e a disponibilidade de compostos orgânicos.

A Figura 68 mostra grânulo de lodo com biofilme/aglomerado sugestivo de *Methanobacterium*. As espécies de *Methanobacterium* são móveis, o que lhes confere a capacidade de locomoção em direção a gradientes de nutrientes ou a locais mais favoráveis em seu ambiente. São organismos com morfologia alongada. A parede celular é composta por proteínas e polissacarídeos.

As células se organizam em longas cadeias, criando uma aparência distintiva sob microscopia eletrônica. Essas cadeias podem variar em comprimento e geralmente se estendem ao longo do ambiente em que os organismos estão presentes. Essa morfologia em cadeias proporciona uma vantagem evolutiva, pois facilita a aderência a partículas orgânicas e a formação de biofilmes.

A MEV permite visualizar e examinar a estrutura tridimensional dessas comunidades microbianas aderidas e revela a organização das células no biofilme, as interações entre elas e a microarquitetura na qual o biofilme é mantido coeso.

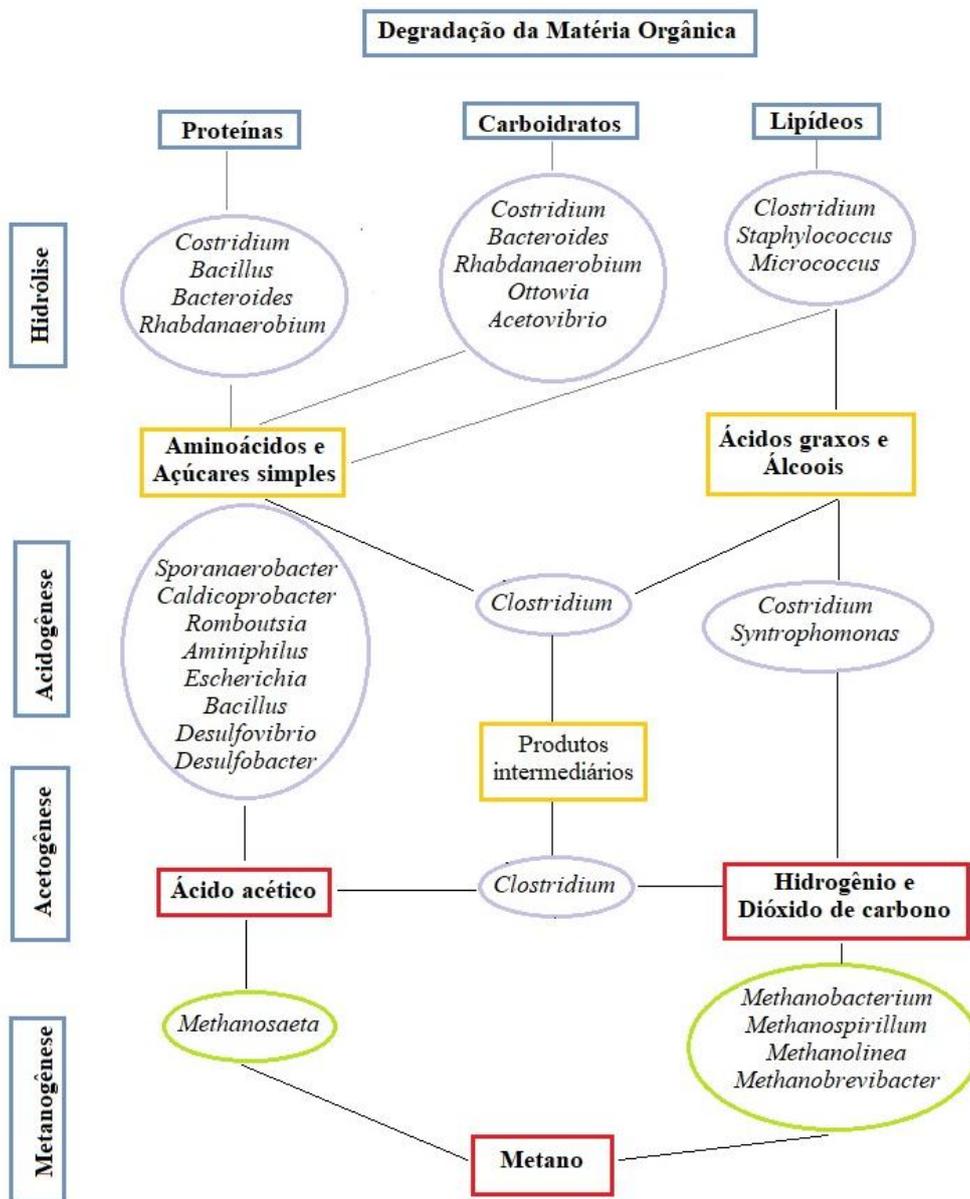
Figura 68. Grânulo de lodo de esgoto



A estrutura interna de biofilmes microbianos, incluindo biofilmes formados por arqueias metanogênicas como *Methanobacterium*, é uma área de pesquisa em constante evolução. Os biofilmes são comunidades microbianas complexas que se desenvolvem em superfícies sólidas ou interfaces líquido-sólido, e a produção e liberação de metano nesses biofilmes geralmente envolve um conjunto de processos metabólicos e interações complexas entre diferentes microrganismos.

A partir das observações dos resultados obtidos no presente estudo, é sugerido (Figura 69) os MO participantes das fases da DA nesta pesquisa. Não é pretendido limitar a complexidade da DA apenas aos MO citados na imagem a seguir, mas sim indicar que os citados muito provavelmente participaram do processo nos reatores anaeróbios estudados.

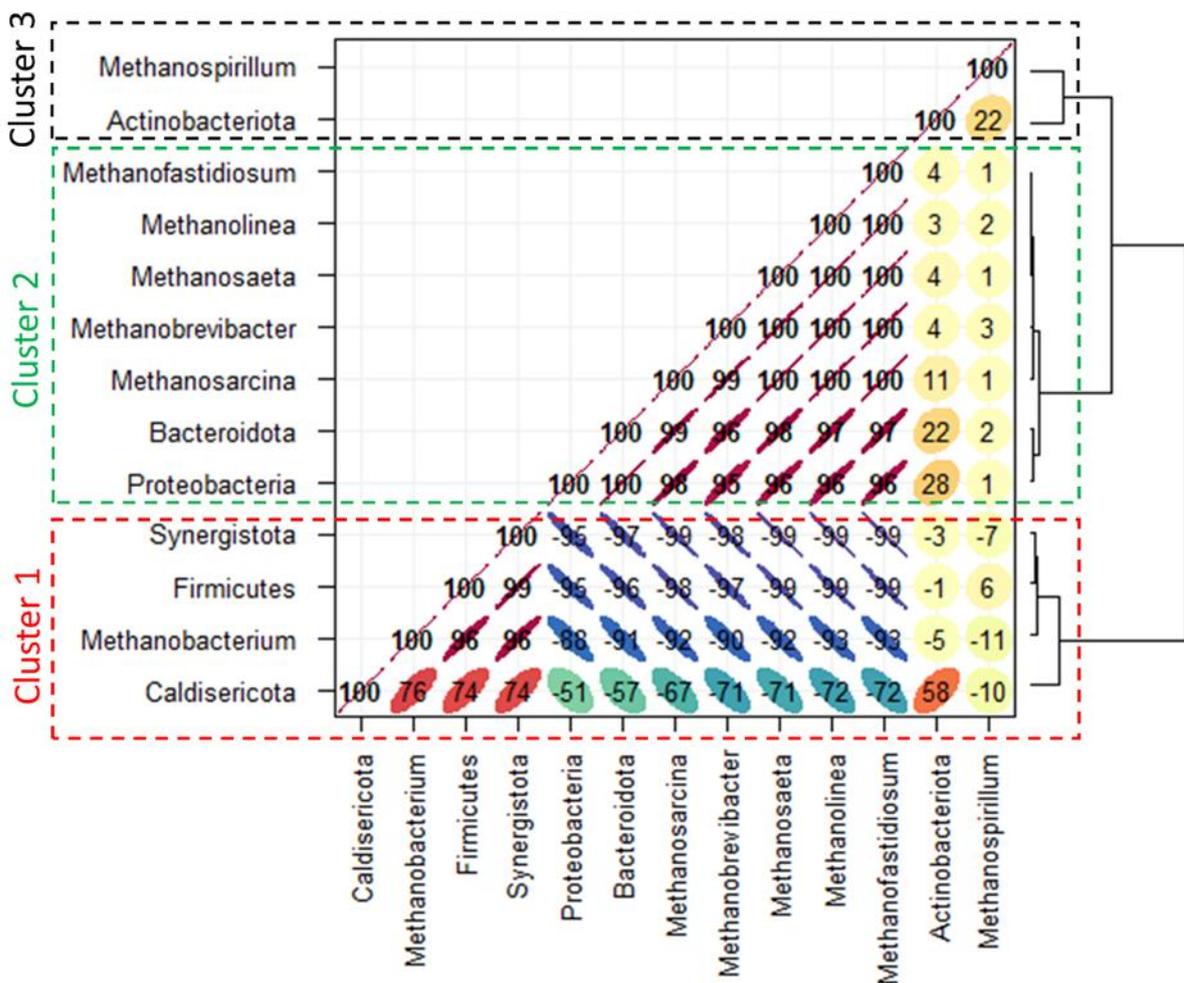
Figura 69. Estágios e microrganismos envolvidos na DA do lodo de esgoto ETE-Alegria



Devido à natureza dinâmica e complexa dos biofilmes microbianos, a pesquisa nessa área é desafiadora, mas é crucial para uma compreensão mais aprofundada dos processos metabólicos e ecológicos associados à produção de metano em ambientes naturais e aplicações biotecnológicas.

A análise de agrupamentos hierárquicos e a matrix de correlação Archaea Bacteria (Fig. 70) evidenciou 3 grupos distintos, ambos constituídos por Bacteria e Archaea.

Figura 70. Análise de agrupamento hierárquico e matrix de correlação Archaea Bacteria



No grupo 1 (Cluster 1), formado por *Methanobacterium*, *Firmicutes*, *Synergistota* e *Caldisericota*, os MO apresentaram correlação positiva entre si, ou seja, o aumento populacional em *Firmicutes*, *Synergistota* e *Caldisericota* está relacionado ao crescimento de *Methanobacterium* nos reatores.

Os MO do Cluster 2 (*Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanolina*, *Methanofastidiosum*, *Methanobrevibacter*, *Proteobacteria* e *Bacteroidota*) estão positivamente relacionadas entre si. Porém, é interessante notar que os MO do grupo 1 estão negativamente correlacionadas com os MO do grupo 2. Ou seja, o aumento do grupo 2 diminui o grupo 1.

Já o terceiro grupo (Cluster 3) ressaltado pela análise, formado por *Actinobacteriota* e *Methanospirillum*, não apresentou correlação com os grupos 1 e 2, sendo evidenciado, também nos experimentos, comportamento independente.

Os MO pertencentes ao grupamento 3 mantiveram a média do número de organismos para *Actinobacteria* e em relação a *Methanospirillum* houve diminuição do número de MO em dois reatores (R4 e R5) e aumento da população em um reator (R6).

3.15 SAOB Bactérias sintróficas oxidantes de acetato

Bactérias sintróficas oxidantes de acetato (SAOB) cooperam com metanogênicos hidrogenotróficos (HM) (Figura 71). As vias de homoacetogênese e oxidante de acetato sintrófico (SAO) regulam a DA através da produção e consumo de acetato, competindo ou cooperando com metanogênicos, cooperando com a acidogênese e sintrofia com bactérias oxidantes de ácidos graxos.

A transferência de H₂ entre seus produtores e consumidores é importante, e muito provavelmente eles vivem em consórcios sintróficos.

Pan et al (2021) observaram que o H₂ consumido pelos metanogênicos ajuda em uma biomassa equilibrada para manter o pH estabilizado. Tanto os produtores de H₂ (acetogênicos) quanto os consumidores de H₂ (metanogênicos) só podem ser favorecidos em uma faixa estreita de concentração de H₂. O H₂ constitui-se em produto final importante no que diz respeito à determinação da energia livre da reação.

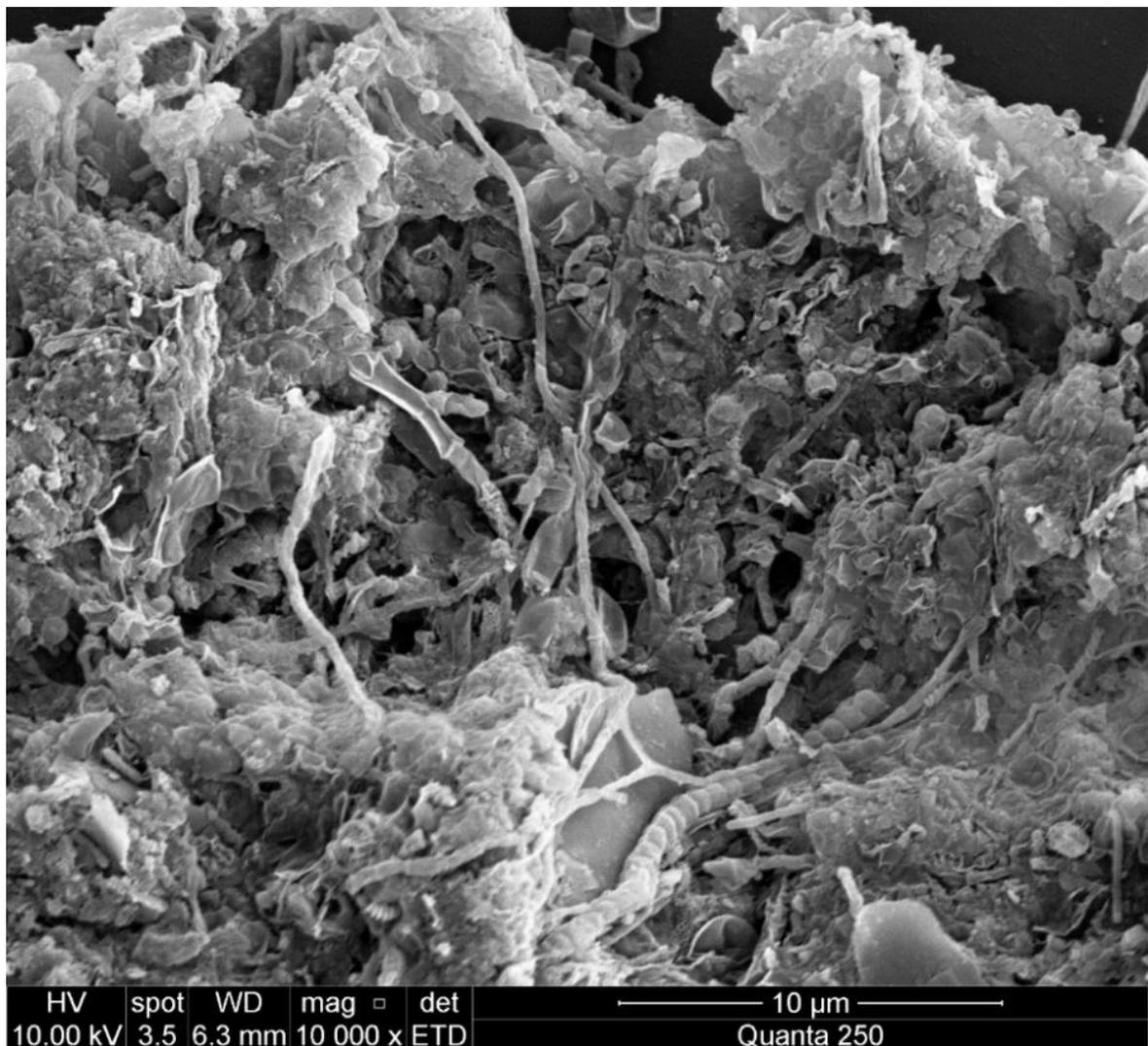
As interações entre esses MO funcionais são bastante complexas, mas as complexas conversões e interações mantêm a sustentabilidade dos digestores anaeróbios, oferecendo flexibilidade para superar o estresse sob diferentes distúrbios ambientais.

O processo de SAO-HM substituiu a metanogênese acetoclástica em alguns ambientes com inibição da atividade de metanogênicos acetoclásticos.

A mudança na comunidade metanogênica muitas vezes também envolve uma mudança na via de degradação do acetato, da metanogênese acetoclástica para a oxidação sintrófica do acetato (SAO) (DYKSMA et al 2020).

O acetato é utilizado por membros das famílias *Methanosarcinaceae* e *Methanosaetaceae*.

Figura 71. Sintrofismo na DA do LE



Os membros das *Methanosarcinaceae* são comparativamente mais versáteis, tendo a capacidade de crescer em diversos substratos diferentes, como acetato, hidrogênio e metanol, enquanto os membros das *Methanosaetaceae* utilizam apenas acetato.

É atualmente desconhecido sob quais condições os oxidantes de acetato sintróficos podem competir com sucesso com metanogênicos acetoclásticos e co-ocorrem com a oxidação do acetato que está acoplada à redução de substâncias orgânicas (CONRAD et al., 2020).

Também foi observado que, mesmo após a operação de reatores por um ano, arqueias hidrogenotróficas continuaram dominando a população metanogênica (LUCAS et al., 2015; TREU et al., 2018) e vários estudos descobriram que o inóculo dominado por H₂ utilizando metanogênicos demonstrou uma taxa de produção de CH₄ melhor do que *Methanosaeta*, um metanogênico acetoclástico (SIEGERT et al. 2014; GAO et al., 2022; QI et al., 2022).

Os metanogênicos hidrogenotróficos e/ou outros utilizadores de H₂ vivem em sintrofia com os acetogênicos, consumindo o H₂ liberado destes últimos. A relação sintrófica torna a acetogênese termodinamicamente viável. O ácido fórmico (HCOOH) e o formato são semelhantes ao H₂, pois são essencialmente H₂ associados ao CO₂ (H₂ + CO₂ = HCOOH).

A acetogênese a partir de outros ácidos orgânicos de peso molecular mais elevado também depende da sintrofia com usuários de H₂ ou formato. Esta sintrofia é baseada na transferência de H₂/formato de MO produtores de H₂ para MO consumidores de H₂, o que é comumente referido como transferência interespecies de H₂.

O H₂ também pode ser pensado como prótons (H⁺) com elétrons associados, e a transferência interespecies de hidrogênio/formato também é uma transferência de elétrons interespecies. Kang et al (2021) mostrou que alguns MO realizam transferência direta de elétrons entre espécies usando pili eletricamente condutivos e os elétrons podem ser transportados desta forma como, por exemplo, de *Geobacter* para *Methanosaeta*.

Esta transferência de elétrons entre espécies é rápida e pode revelar-se um mecanismo importante para a DA estável no futuro; mais pesquisas são necessárias para compreender mais completamente os mecanismos diretos de transferência de elétrons entre espécies e como isso pode ser incentivado em sistemas projetados (SUN et al 2023).

O crescimento de *Synergistota* nos reatores do presente estudo pode estar relacionado ao também aumento do número de *Methanobacterium* hidrogenotrófica. WESTERHOLM and SCHNÜRER (2019) analisaram a adaptação e a degradação de compostos em reatores anaeróbios e sugeriram também a possível associação entre *Synergistes* e metanogênicos hidrogenotróficos.

3.16 Meta-análise da codigestão (coDA) do lodo de esgoto

O número de artigos dedicados à coDA de LE de ETEs em experimentos BMP entre os anos de 1950 a 2022 totalizam 251 artigos, cabe ressaltar que 179 artigos foram publicados nos últimos 5 anos. Esta revisão se concentra nos estudos mais atuais de coDA e produção de CH₄ de LE entre 2012 e 2022, totalizando 90 artigos.

A Tabela 22 identifica todos os tipos de coDA encontrados nos respectivos estudos e a Tabela 23 o rendimento específico do CH₄ para os diferentes experimentos BMP com diferentes substratos.

Tabela 22. Meta-análise de coDA entre 2012 e 2022

| Codigestão com LE | Artigos (n) |
|--------------------------------------|-------------|
| Resíduo alimentar | 18 |
| Óleo e gordura | 17 |
| RSU | 7 |
| Estrume | 6 |
| Resíduo sanitário industrial | 6 |
| Bagaço de cana | 4 |
| Alga | 4 |
| Resíduo de matadouro | 4 |
| Resíduos de indústria de laticínios | 4 |
| Óleo e gordura + RSU | 4 |
| Resíduo de jardim | 4 |
| Res. Alimentar + Alga | 2 |
| Lixiviado de aterro | 2 |
| Estrume + Óleo e gordura | 2 |
| Res. Alimentar + Óleo e gordura | 2 |
| Res. Ind. Laticínio + Óleo e gordura | 2 |
| Res. alimentar + Res. jardim | 1 |
| Resíduos de pescado | 1 |

O parâmetro de seleção de substrato predominante para a coDA na literatura diz respeito à razão carbono orgânico total para nitrogênio total (C/N) da solução de alimentação, com a razão ideal geralmente aceita na faixa de 15:1 a 30:1 (WEILAND, 2010).

Como os substratos geralmente não possuem uma relação C/N ideal, a coDA pode melhorar mutuamente o desempenho geral e a estabilidade dos processos.

Em geral, o LE tem uma baixa relação C/N. Apesar de um potencial de biometano um tanto limitado, o LE pode fornecer uma alta capacidade tampão e todos os micronutrientes necessários para o processo de DA (MATA-ALVAREZ et al., 2021).

Tabela 23. Estudos CoDA com lodo de esgoto ETE em BMP conduzidos por outros autores.

| Autor | Ano | LE + CoSubstrato | Feedstock | Temp | TRH | Rendimento metano | U |
|--------------|------|-----------------------|------------|------|-----|-------------------|---------------|
| Alves | 2021 | Glicerol | 1%; 3% | 37 | 20 | 223; 368 | mL CH4 gVS |
| Romero-Guiza | 2021 | Glicerol | 5%; 10% | 35 | | 330; 405 | mL CH4 gVS |
| Bai | 2020 | Estrume de porco | (21:1) | 35 | | 200 | mL CH4 gVS |
| Azarmanesh | 2020 | Resíduo de comida | (1:1) | 35 | | 345 | mL CH4 gVS |
| Gu | 2020 | Resíduo de comida | (1:1) | 37 | | 402 | mL CH4 gVS |
| Pan | 2019 | Resíduo de comida | (1:1) | 37 | | 198 | mL CH4 gVS |
| Ripoll | 2020 | Resíduo de queijo | (1:1) | 35 | | 225 | mL CH4 gVS |
| Du | 2017 | Alga | (1:2) | 35 | | 329 | mL CH4 gVS |
| Zhang | 2021 | Estrume de porco | (1:2) | 37 | | 315 | mL CH4/g VS |
| Xie | 2017 | Resíduo de comida | (1:1) | 35 | 13 | 799 | mL CH4/g VS |
| Xie | 2017 | Rejeito de papel | (1:1) | 35 | 13 | 368 | mL CH4/g VS |
| Kashi | 2022 | Lodo ativado | (1:1) | meso | 35 | 285 | mL CH4/g VS |
| ZOU | 2018 | Resíduo de vegetação | (1:2) | 35 | 40 | 161 | ml CH4 / g VS |
| ZOU | 2018 | Bagasso de cana | (1:2) | 35 | 40 | 132 | ml CH4 / g VS |
| ZOU | 2018 | Resíduo de chá | (1:2) | 35 | 40 | 143 | ml CH4 / g VS |
| XU | 2020 | Estrume de porco | 6% | 35 | 42 | 226 | mL CH4 gVS |
| Grosser | 2020 | Resíduo caixa gordura | (7:3) | 37 | 30 | 306 | mL CH4 gVS |
| Grosser | 2020 | RCG + OFMSW | (60:30:10) | 37 | 30 | 259 | mL CH4 gVS |
| Wang | 2020 | Gramma | (1:1) | 55 | 5 | 293 | mL CH4 gVS |
| Nielfa | 2021 | OFMSW | (62:37) | 35 | | 200 | mL CH4 gVS |
| Wu | 2021 | Resíduo pescado | 1.5%, 3% | 37 | 50 | 410; 683 | mL CH4 gVS |
| Zhang | 2021 | Resíduo de comida | (1:1) | 37 | 35 | 296 | mL CH4 gVS |

3.17 Co-digestão de lodo de esgoto e sardinha

A Tabela 24 mostra os dados físico-químicos para a coDA do lodo de esgoto e sardinha no presente estudo.

Tabela 24. Parâmetros físico-químicos coDA

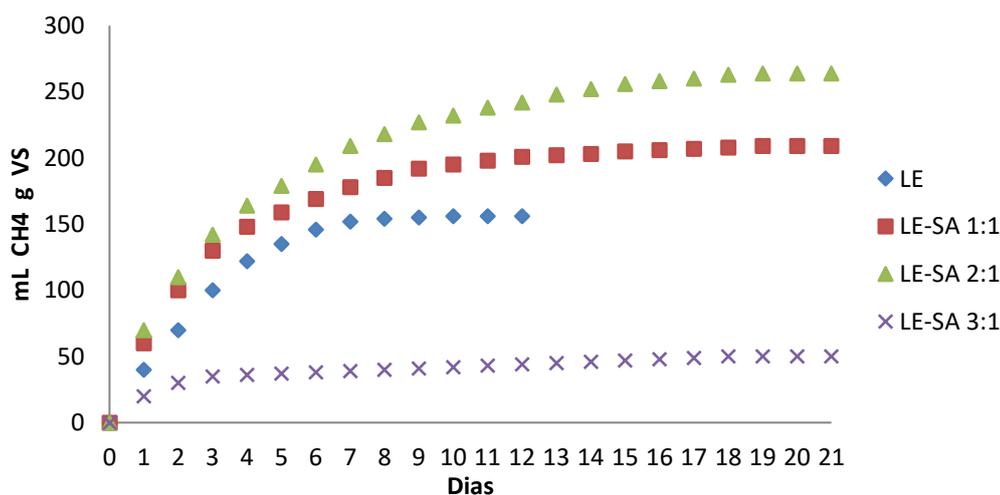
| Parâmetros | Unidade | Lodo de esgoto | Sardinha | DQO _f mg L ⁻¹ |
|--------------|-------------------------------------|----------------|----------|--|
| TS | % | 3.0 | 6.8 | 11338 |
| VS | % | 1.0 | 3.4 | 11338 |
| VSS | % | 0.8 | 2.1 | 20435 |
| TOC | mg L ⁻¹ | 970 | - | 20435 |
| Alcalinidade | mgCaCO ₃ L ⁻¹ | 2564 | 2560* | 16512 |
| CODi | mg L ⁻¹ | 24309 | - | 16512 |
| PHi | | 7.45 | 6.8 | 21450 |

| | | | | |
|--------------|---|-----------------|-----|-------|
| C/N | % | 8.5** | 11* | 21450 |
| Carboidratos | % | 29** | 10* | - |
| Proteínas | % | 5 ⁺ | 30* | - |
| Lípidos | % | 10 ⁺ | 15* | - |

* Panpong 2017, **Alves, 2021, ADM1⁺

A Figura 72 mostra as diferentes proporções de mistura de CH₄. Uma proporção de mistura de 2:1 de SA e LE (SA-LE2) gerou a maior produção de rendimento de CH₄ (310 ± 0,7 ml CH₄/g VS) seguido por uma proporção de mistura de 1:1 (SA-LE1) (209 ± 2,1 ml CH₄/g VS). A proporção de mistura 3:1 (SA-LE3) para coDA de LE e SA alcançou um rendimento de CH₄ (50 ml CH₄/g VS) inferior a monodigestão LE (156 ± 1,4 ml CH₄/g VS).

Figura 72. Proporções de mistura de coDA e rendimento do metano.



Legenda: LE (lodo de esgoto), SA (sardinha).

As diferenças no rendimento de CH₄ registradas na literatura para o mesmo tipo de substratos podem ser resultado de vários fatores. Apesar disso, os ensaios de BMP podem ser ferramentas úteis para determinar como a adição de substratos no digestor de LE afetará o rendimento de CH₄ e, como consequência, permitirá a seleção da composição ideal da matéria-prima. No entanto, se os testes não forem conduzidos nas mesmas condições, eles devem ser utilizados para avaliar tendências e não os valores dos rendimentos de CH₄ em si (GROSSER., 2018).

Quando a SA foi misturada com o LE, o teor de matéria orgânica aumentou, a produtividade do biogás melhorou, as taxas de redução do lodo aumentaram e a eficiência operacional da coDA foi melhorada.

A produtividade e o rendimento específico do CH₄ podem ser parâmetros sensíveis no que diz respeito à viabilidade econômica da produção de biogás (CHOI, 2021) os quais consomem H₂ e ácido acético por serem ambientalmente sensíveis (como pH, tempo de residência, liquefação do substrato, conteúdo orgânico, proporção de mistura, temperatura) e crescem lentamente (MITTALA et al., 2019; STUNZENAS e KLIPOVA, 2018). A ativação dos MO metanogênicos e o aprimoramento da adaptabilidade ambiental estão relacionados à produtividade do biogás (KHAYUM et al., 2018).

A produção mais baixa de CH₄ no experimento SA-LE3 pode estar relacionada à sobrecarga de resíduos/inóculo também relatada por EIROA et al (2012) o que pode ser decorrente à sobrecarga no sistema devido ao acúmulo de ácidos graxos. Os resíduos do processamento de pescado apresentam problemas tecnológicos distintos, pois liberam altos níveis de amônia quando digeridos e podem reduzir ou inibir a digestão de substratos (IVANOV et al., 2018).

Para resíduos de atum, sardinha e peixe agulha, cerca de 0,47 g DQO-CH₄/g DQO adicionados foram obtidos em experimentos em batelada com 1% TS (EIROA, 2012).

Vários grupos de pesquisa têm se concentrado na tentativa de explicar os fatores ambientais que impulsionam o processo de DA; a partir desses trabalhos, é possível concluir que a temperatura de operação (LEVE'N et al. 2007), o tipo de substrato (ZHANG et al. 2014) e o inóculo são fatores importantes os quais selecionam diferentes populações (ALI SHAH et al. 2014).

A Tabela 25 mostra a proporção da produção de metano e DQO final para os experimentos conduzidos em laboratório.

Tabela 25. Produção do rendimento do metano coDA

| Substrato | CoSub % vs | pHi | pHf | Alcalinidade mgCaCO ₃ /L | DQOi mg/L | DQOf mg/L | HRT dias | mL CH ₄ g VS Média/dp |
|-----------|---------------|------|------|--|--------------|--------------|-------------|-------------------------------------|
| LE | - | 7.45 | 7.63 | 2564 | 24309 | 11338 | 12 | 156±1.4 |
| LE | SA 1:1 | 7.45 | 7.53 | 2564 | 24309 | 20435 | 21 | 209±2.1 |
| LE | SA 2:1 | 7.45 | 7.26 | 2564 | 24309 | 16512 | 21 | 310±0.7 |
| LE | SA 3:1 | 7.45 | 6.87 | 2564 | 24309 | 21450 | 21 | 50±0.7 |

Legenda: CoSub (proporção do co-substrato).

Condições de baixo teor de sólidos podem diminuir a atividade microbiana nos digestores, tornando a desidratação e o espessamento do lodo uma etapa essencial antes da digestão (FILER et al., 2019).

Como os resultados foram normalizados por VS, a menor produção de CH₄ indicou degradação ineficiente do substrato, provavelmente devido à menor atividade microbiana.

Estudos anteriores analisaram diferenças na biodegradabilidade anaeróbia e nos parâmetros cinéticos, avaliando o potencial de CH₄ de partes individuais de resíduos e misturas de todas as partes de peixes (CHOUDHURY et al., 2022; DONOSO-BRAVO et al., 2015; GRUDULS et al., 2018). Esses estudos descobriram que a taxa de hidrólise dependia da fração de miudezas e da composição do peixe. A produção de CH₄ variou de 261 a 933 mL CH₄/g VS, com escamas e intestinos de peixes (vísceras) apresentando o menor e o maior potencial de produção de CH₄, respectivamente.

As amostras de vísceras de peixes produziram o maior teor de CH₄, independente da espécie de peixe utilizada, devido ao seu alto teor de lipídios e relação C/N. O alto teor de lipídios das vísceras de peixes sugere que todas as partes das vísceras de peixes podem ser utilizadas na DA como única fonte de carbono (GREGGIO et al., 2018). Xu et al. (2017) observaram teores de CH₄ no biogás variando de 63 a 78% para a monodigestão de miudezas de peixes, tipicamente obtidas a partir da digestão de lipídios e não de esterco animal (ABDUL AZIZ et al., 2019).

Suhr et al. (2015) descobriram que o potencial médio de CH₄ dos resíduos sólidos da aquicultura era comparável ao potencial de CH₄ de outras fontes de esterco (84 – 264 mL CH₄/g VS para esterco de carne bovina, leiteira, suína e de aves).

A sobrecarga de substratos ricos em lipídios pode levar a desafios para os operadores de DA (CHEN et al., 2014; GREGGIO et al., 2018; MOODY et al., 2011; XU et al., 2017). A quebra de lipídios dentro de um sistema DA resulta na formação de ácidos graxos (consistindo de 12 a 20 átomos de carbono). Altas concentrações de ácidos graxos podem aumentar as taxas de carregamento, uma vez que a hidrólise de gorduras e óleos em glicerol é um processo rápido, resultando no acúmulo de ácidos graxos.

A produção excessiva de ácidos graxos também pode resultar em instabilidade na digestão devido a uma redução na atividade de acetogênicos de β-oxidação e archaeas metanogênicas, interrompendo o transporte de nutrientes através da membrana celular (EIROA et al., 2012; MANNACHARAJU et al., 2020; WU e CANÇÃO, 2021).

A inibição causada pelo acúmulo de ácidos graxos pode reduzir significativamente as eficiências da acidogênese e acetogênese e pode impactar as vias de metanogênese acetoclástica e hidrogenotrófica (GREGGIO et al., 2018).

Tanto os lipídios quanto as proteínas possuem maior potencial de CH₄ do que os carboidratos, tornando as vísceras de peixe uma matéria-prima adequada para substrato de coDA em sistemas de DA (CHOUDHURY et al., 2022).

3.18 Análise qPCR da co-digestão anaeróbia do lodo

A quantificação de bactérias totais, Archaea e genes marcadores funcionais foi realizada por PCR quantitativa (qPCR) em um sistema QuantStudio-3 Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Para quantificar o potencial metabólico metanogênico das amostras, foram realizados ensaios de qPCR com os genes 16S rRNA e mcrA (Figura 73). As quantificações do gene 16S rRNA mostraram que em todos os tratamentos, a comunidade variou de $5,72 \times 10^{11}$ a $9,88 \times 10^{11}$ cópias médias por grama de lodo anaeróbio fresco e $1,11 \times 10^{13}$ a $1,10 \times 10^{14}$ por grama de lodo seco, sem diferenças entre os tratamentos por ANOVA. Para mcrA, as médias variaram de $1,79 \times 10^8$ a $4,54 \times 10^8$ por grama de lodo anaeróbio fresco e $5,01 \times 10^9$ a $4,05 \times 10^{10}$ por grama de lodo seco, novamente sem diferenças entre os tratamentos por ANOVA.

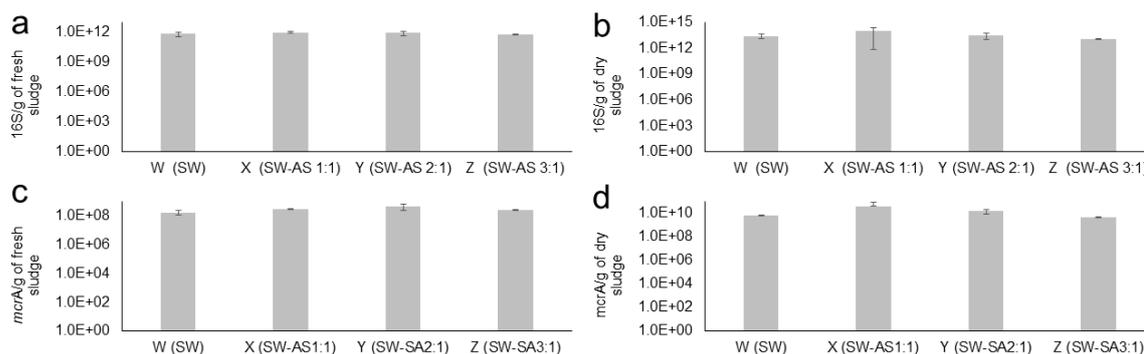
Com base nos resultados citados, podemos inferir que, embora as proporções de SA para LE tenham sido alteradas, o tamanho das comunidades procarióticas e metanogênicas foram muito próximos.

Desta forma, a simples quantificação do gene associado a metanogênese não fornece dados suficientes para avaliar as mudanças na comunidade microbiana frente aos diferentes tratamentos de co-digestão testados.

A diferença na produção de CH₄ pode estar relacionada à uma composição diferente na comunidade de bactérias e archaeas e não diretamente associada à carga microbiana. A caracterização filogenética da comunidade de bactérias e arqueias pode ser mais efetiva como mostrado nos resultados anteriormente discutidos.

O fato de termos diferentes taxas de produção de CH₄ está associado à atividade da comunidade e não ao potencial genético para tal.

Figura 73. Ensaios de qPCR com os genes 16S rRNA e mcrA



Legenda: (a) cópias de 16S rRNA por grama de lodo anaeróbico fresco, (b) cópias de 16S rRNA por grama de lodo anaeróbico seco, (c) cópias de mcrA por grama de lodo anaeróbico fresco, e (d) cópias de mcrA por grama de lodo anaeróbico seco. W=SW (monodigestão); X=SW-SA1:1; Y=SW-SA2:1; Z=SW-SA3:1. Não foram encontradas diferenças de acordo com ANOVA de um fator. 16S: $R^2 = 0.99$; $E = 98.1\%$. mcrA: $R^2 = 0.98$; $E = 97\%$.

Em digestores anaeróbios, apesar da grande variação entre tratamentos e processos, os perfis parecem ser semelhantes em classificações taxonômicas (presença frequente de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*), indicando a ocorrência de um táxon comunitário central desempenhando funções-chave ao longo das fases da DA.

A alta diversidade em níveis taxonômicos aliada à redundância da comunidade parece ser o fator mais importante para garantir a capacidade do reator para superar condições adversas, mais do que resistência e resiliência da comunidade microbiana (DE VRIEZE et al., 2017).

Para otimizar o processo de DA e orientá-lo na direção desejada, é importante ter conhecimento e compreensão das capacidades metabólicas de MO chave. O conhecimento do nível de redundância funcional dentro da comunidade (com que facilidade a comunidade microbiana se adapta às mudanças operacionais) e os requisitos microbianos para tais atividades também podem ajudar a identificar o gerenciamento operacional e as práticas para melhorar o desempenho do processo.

Com os avanços contínuos nas técnicas moleculares e nos estudos de cultivo, a lista de MO anaeróbios responsáveis por diferentes vias de degradação é continuamente atualizada. A complexidade da cooperação envolvida na degradação é ainda ilustrada pelo fato de que membros de um mesmo gênero são frequentemente capazes de degradar compostos quimicamente diferentes.

Além disso, mesmo quando o mesmo inóculo e parâmetros operacionais são inseridos durante a inicialização, diferentes desempenhos de processos e comunidades microbianas podem evoluir. Isto ilustra que fatores estocásticos desempenham um papel importante na montagem da comunidade microbiana em reatores de biogás. Também se destaca a necessidade de mais pesquisas sobre o impacto da fonte do inóculo e das condições operacionais nos efeitos de longo prazo e no desempenho otimizado.

Este trabalho constituiu o início dos estudos com biogás proveniente de ETE nos laboratórios GESAR e LABIFI da UERJ. Avanços foram alcançados e questionamentos também foram levantados. Desta forma, algumas sugestões para a continuidade e o avanço desta pesquisa estão contidas no próximo tópico.

CONCLUSÕES

O presente estudo baseou-se na montagem de biorreatores em escala de bancada (ensaios BMP) e no uso de dados experimentais obtidos para alimentar o modelo matemático ADM1, com subsequente calibração e validação para simular a digestão anaeróbia de lodo de esgoto obtido de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais municipal. Os ensaios BMP em escala de bancada resultaram em uma produção acumulada de CH₄ variando de 124 a 143 NmL CH₄ e rendimentos de CH₄ variando de 113 a 130 mL CH₄ g⁻¹ SV após 11 dias de ensaio BMP.

Foi desenvolvido um método que emprega aplicações acopladas do modelo ADM1 e ensaios BMP, combinados com um método de otimização iterativa. Esse método visa caracterizar o lodo de esgoto e avaliar o potencial de produção de biogás por uma composição equivalente que produz curvas metanogênicas semelhantes.

A abordagem apresentada nesta investigação pode ser utilizada para projetar experimentos em reatores em batelada utilizando lodo de esgoto como matéria-prima para produzir biogás e otimizar a produção de biogás na planta de biogás em grande escala, o que é muito importante para uso prático.

Os resultados obtidos podem ser utilizados, não apenas para definir experimentos em reatores em batelada utilizando lodo de esgoto como matéria-prima para produzir biogás, mas também para investigar as comunidades microbianas associadas à produção de metano utilizando ferramentas de biologia molecular.

Os ensaios BMP com LE como matéria-prima mostraram uma diversidade bacteriana consistente com o perfil esperado no processo de digestão anaeróbia. *Firmicutes* foi o filo bacteriano dominante (54.26% – 78.41%) durante a DA, seguido por *Synergistota* (7.50% - 9.65%). *Sporanaerobacter* (43% - 47%) e *Clostridium* (19%) foram os gêneros bacterianos dominantes nos reatores BMP.

A mudança na comunidade metanogênica de *Methanosaeta* (43.12% - 54.52%) para *Methanobacterium* (76.51% - 93.71%) pode estar relacionada ao aumento dos filas *Firmicutes* e *Synergistota* nos reatores, afetando o grau de fermentação do substrato, que contém bactérias oxidantes de acetato, as quais convertem acetato a hidrogênio, o qual é consumido pelos organismos metanogênicos, tornando a reação termodinamicamente possível para esses grupos.

As comunidades microbianas ilustradas no presente estudo expandem o conhecimento atual sobre o lodo de esgoto metanogênico gerado em uma Estação de Tratamento de Esgotos

e os resultados obtidos podem ajudar a elucidar novos horizontes para futuros estudos de ecologia microbiana e aprimorar a produção de biogás a partir de lodo de esgoto.

Para uso prático na indústria, o conhecimento gerado pode auxiliar no fortalecimento de uma planta/instalação de digestão anaeróbia que está com problemas, adicionando microbiotas centrais as quais podem ser confirmadas como predominantes em um período operacional anteriormente satisfatório e, no caso da ETE-Alegria, para o período de estudo, *Sporanaerobacter* e *Clostridium*, ambos do filo *Firmicutes*.

De acordo com os experimentos realizados em laboratório, o lodo de esgoto da ETE-Alegria apresenta maior produção de biogás metano quando submetido a temperatura na faixa mesofílica.

O consumo/liberação do acetato no LE da ETE-Alegria não segue necessariamente um padrão canônico com acetoclásticos metanogênicos como o predominante ou único processo metabólico, apesar de o LE conter populações de supostas arqueias metanogênicas acetoclásticas.

As bactérias acetogênicas redutoras de sulfato são componentes persistentes e importantes na comunidade produtora de metano em reatores mesofílicos de biogás no presente estudo.

Os filos *Synergistes* e *Firmicutes* observados no presente estudo possivelmente contém bactérias capazes de performar metabolismo sintrófico em associação com metanogênicos hidrogenotróficos, no caso observado, *Methanobacterium*.

SUGESTÃO ESTUDOS FUTUROS

- Recomenda-se estudos adicionais aplicando ensaios BMP e simulações computacionais tanto dos processos AR quanto BMP, incluindo simulações de transporte de fluxo e partículas, para uma melhor compreensão do processo de digestão anaeróbia.
- A combinação de testes BMP e dados biológicos pode ser útil para prever as melhores condições para operar reatores anaeróbios visando a produção de bioenergia.
- Estudar a comunidade metanogênica associada a salinidade em ETEs litorâneas/costeiras.
- Caracterizar e desenvolver testes BMP com lodo de esgoto de biodigestores de outras ETEs.
- Estudo dos ácidos voláteis (propionato, acetato, butirato e valerato) no biodigestor e no modelo computacional ADM1.
- Considerando a fase inicial da DA – hidrólise ser realizada por bactérias hidrolíticas e possivelmente, também fungos. Estudar e desenvolver pesquisas com fungos para avaliar a DA.
- Estudar a produção de polihidroxicanoatos (PHAs) pela comunidade metanogênica em digestores anaeróbios.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de biogás por meio da digestão anaeróbia permite a recuperação de energia renovável e nutrientes a partir de vários resíduos orgânicos, sendo assim de grande importância para a transição para uma sociedade mais sustentável.

O desempenho e a estabilidade do processo de biodigestão dependem significativamente de diversos grupos microbianos, e suas redes e funções, por sua vez, são influenciadas pelas características do substrato e pelos parâmetros operacionais.

Com os avanços recentes em técnicas moleculares, o conhecimento sobre microrganismos anaeróbios e suas respostas a diferentes condições operacionais aumentou consideravelmente. Esse conhecimento possibilitou o desenvolvimento de abordagens mais controladas de gestão e monitoramento, visando garantir alta eficiência e estabilidade do processo.

No entanto, com o aumento do conhecimento sobre a microbiologia dos processos de biogás, tornou-se evidente que a microbiota envolvida é ainda mais complexa e difícil de visualizar do que inicialmente pensado, especialmente porque muitos membros dentro de um determinado gênero frequentemente conseguem degradar compostos quimicamente muito diferentes. Além disso, muitos organismos pertencem a filos candidatos ou são até mesmo desconhecidos, e ainda precisam ser isolados e caracterizados para uma compreensão completa de seu papel no sistema de biogás.

Portanto, para estabelecer políticas operacionais eficazes visando atingir o máximo desempenho no processo de biogás, é importante aprimorar o entendimento sobre microrganismos e suas funções, além de desenvolver uma compreensão preditiva da interação entre a estrutura da comunidade microbiana, parâmetros operacionais e desempenho através de ferramentas de aprendizado de máquina e simulação computacional.

A sociedade evolui se com ela evoluírem os mecanismos disponíveis para a qualidade da vida, isto inclui tecnologia. E que a tecnologia sirva para nos tornar mais humanos.

REFERÊNCIAS

ABDUL AZIZ, N. I. H.; HANAFIAH, M. M.; MOHAMED ALI, M. Y. Sustainable biogas production from agrowaste and effluents – A promising step for small-scale industry income. *Renewable Energy*, v. 132, p. 363–369, 2019.

ABENDROTH, C.; SIMEONOV, C.; PERETÓ, J.; ANTÚNEZ, O.; GAVIDIA, R.; Luschnig, O.; Porcar, M. From grass to gas: Microbiome dynamics of grass biomass acidification under mesophilic and thermophilic temperatures. *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

ABIOGÁS. Associação Brasileira do Biogás. Proposta de Programa Nacional do Biogás e do Biometano-PNBB. São Paulo: ABIOGÁS, 2018.

ABIOGÁS. Associação Brasileira do Biogás. Nota técnica potencial do biogás. São Paulo: ABIOGÁS, 2020.

ABIOGÁS. Associação Brasileira do Biogás. Nota técnica potencial do biogás. São Paulo: ABIOGÁS, 2022.

ALCANTARA, P. B. Avaliação da influência da composição de resíduos sólidos urbanos no comportamento de aterros simulados. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Engenharia Civil, 2007.

ALEX, J.; BENEDETTI, L., COPP, J., GERNAEY, K., JEPPSSON, U., NOPENS, I., PONS, M.; ROSEN, C., STEYER, J., VANROLLEGHEM, P. Benchmark Simulation Model No. 2 (BSM2); International Water Association: London, UK. 2019.

ALLEN, C., MAZANKO, A., ABDEHAGH, N., EBERL, H.J. A New ODE-Based Julia Implementation of the Anaerobic Digestion Model No. 1 Greatly Outperforms Existing DAE-Based Java and Python Implementations. *Processes*, v.11, p. 1899, 2023.

ALMEIDA, R. N. et. al. A problemática dos resíduos sólidos urbanos. *Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente*, v. 2, n. 1, p. 25-36, 2023.

ALVES, I. R. F. S.; MAHLER, C. F.; OLIVEIRA, L. B.; REIS, M. M.; BASSIN, J. P. Assessing the use of crude glycerol from biodiesel production as an alternative to boost methane generation by anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Biomass and Bioenergy*, v. 143, 2020.

ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. 2020 Atlas de Esgotos: despoluição de bacias hidrográficas. Agência Nacional de Águas, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. 88p.

ANANTASOOK, N.; WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A.; GUNUN, P. Changes of Microbial Population in the Rumen of Dairy Steers as Influenced by Plant Containing Tannins and Saponins and Roughage to Concentrate Ratio. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, v.26, p.1583–1591, 2013.

ANGELIDAKI, I. et al. Biogas upgrading: current and emerging technologies. *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels*, p. 817-843, 2019.

ANGELIDAKI, I. et al. Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. *Biotechnol Adv.*, v. 36(2), p.452-466, 2018.

ANGELIDAKI, I. et al. Defining the Biomethane Potential (BMP) of Solid Organic Wastes and Energy Crops: A Proposed Protocol for Batch Assays. *Water Sci. Technol.*, v. 59, p. 927–934, 2009.

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the Anaerobic Biodegradability of Macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, v.3, p.117–129, 2004.

ANDERSSON, J.; HELANDER-CLAESSON, J.; OLSSON, J. Study on reduced process temperature for energy optimisation in mesophilic digestion: A lab to full-scale study. *Applied Energy*, v. 271, 115108, 2020.

ANDREOLI, C. V.; von SPERLING, M.; FERNANDES, F. Lodo de Esgotos: Tratamento e Disposição Final. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Companhia de Saneamento do Paraná, 484p. 2001.

APHA, American Public Health Association, Standard Methods for Evaluation of Water and Wastewater, 23nd. ed. American Water Works Association, Washington, DC, 2017.

AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

ASTALS, S. et al. Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: a biodegradability and modelling study. *Water Research*, v. 47, n. 16, p. 6033-6043, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 9648: Estudo de concepção de sistemas de esgoto sanitário. Rio de Janeiro: ABNT, 1986.

ABNT NBR 12209, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12209: Elaboração de projetos hidráulico-sanitários de estações de tratamento de esgotos sanitários. Rio de Janeiro, 2011. 53p.

BAI, X.; CHEN, Y. C. Synergistic effect and supernatant nitrogen reduction from anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Bioresource Technology Reports*, v. 10, 100424, 2020.

BARLAAN, E. A.; SUGIMORI, M.; FURUKAWA, S.; TAKEUCHI, K. Electronic microarray analysis of 16S rDNA amplicons for bacterial detection. *J. Biotechnol.*, v. 115, p.11–21, 2005.

BATSTONE, D. J.; PUYOL, D.; FLORES-ALSINA, X.; RODRÍGUEZ, J. Mathematical modelling of anaerobic digestion processes: applications and future needs. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v.14, p 595–613, 2015.

BATSTONE, D. J.; VIRDIS, B. The role of anaerobic digestion in the emerging energy economy. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p.142–149, 2014.

BATSTONE, D. Mathematical modelling of anaerobic reactor treating domestic wastewater: rational criteria for model use. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 5, p. 57-71, 2006.

BATSTONE, D.J.; KELLER, J. Industrial applications of the IWA anaerobic digestion model No.1 (ADM1). *Water Science Technology*, v.47, p. 199-206, 2003.

BATSTONE, D. J.; KELLER, J.; ANGELIDAKI, I.; KALYUZHNYI, S.V.; PAVLOSTATHIS, S.G.; ROZZI, A.; SANDERS, W. T. M.; SIEGRIST, H.; VAVILIN, V.A. IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes. Anaerobic Digestion Model No. 1, Scientific and Technical Report No. 13, IWA Publishing, London, UK, 2002.

BENSMANN, A.; HANKE-RAUSCHENBACH, R.; HEYER, R.; KOHRS, F.; BENNDORF, D.; KAUSMANN, R.; PLÖCHL, M.; HEIERMANN, M.; REICHL, U.; SUNDMACHER, K. Diagnostic concept for dynamically operated biogas production plants. *Renew. Energ.*, v. 96, p. 479–489, 2016.

BEP – BRAZIL ENERGY PROGRAM. Biogás no Brasil: Potencial de descarbonização a curto prazo. Programa de Energia para o Brasil – BEP (Brasil). Relatório técnico 01-2022. São Paulo/SP: Instituto 17, 2022.

BIAŁOBRZEWSKI, Ireneusz; WASZKIELIS, Katarzyna; BUŁKOWSKA, Katarzyna. The application of Anaerobic Digestion Model No. 1 for the optimization of biogas production from maize silage, pig manure, cattle manure, and digestate in a full-scale biogas plant. *Fuel*, v. 357, p. 129789, 2024.

BID; MMA. Documento-base para subsidiar os Diálogos Estruturados sobre a Elaboração de uma Estratégia de Implementação e Financiamento da Contribuição Nacionalmente Determinada do Brasil ao Acordo de Paris. Banco Interamericano de Desenvolvimento e Ministério do Meio Ambiente, 2017.

BIELSCHOWSKY, M. C. Modelo de gerenciamento de lodo de estação de tratamento de esgotos: aplicação do caso da bacia da Baía de Guanabara. 2014. Dissertação de Mestrado Programa de Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 165p.

BNDES. A Bioeconomia Brasileira em Números. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, setorial n° 47, 2018.

BOE, K. 2006. Online monitoring and control of the biogas process. Ph.D. thesis, Institute of Environment & Resources, Technical University of Denmark.

BOE, K. et al. State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water Research*, v. 44, n. 20, p.5973-5980, 2010.

BOETIUS, A.; ANESIO, A. M.; DEMING, J. W. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nat Rev Microbiol*, v.13, p.677, 2015.

BOROWSKI, P. F.; BARWICKI, J. Efficiency of Utilization of Wastes for Green Energy Production and Reduction of Pollution in Rural Areas. *Energies*, v. 16, n. 1, p. 13, 2022.

CABBAI, V., BALLICO, M., ANEGGI, E., GOI, D. BMP tests of source selected OFMSW to evaluate anaerobic codigestion with sewage sludge. *Waste Management*, v. 33, p.1626–1632, 2013.

CABEZAS, A. et al. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? *Rev Environ Sci Biotechnol*, v.14, p.555–593, 2015.

CAI, M.; WILKINS, D.; CHEN, J.; LU, H.; JIA, Y.; LEE, P.K. Metagenomic reconstruction of key anaerobic digestion pathways in municipal sludge and industrial wastewater biogas-producing systems. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-12, 2016.

CAI, Weiwei et al. Electro-driven methanogenic microbial community diversity and variability in the electron abundant niche. *Science of the Total Environment*, v. 661, p. 178-186, 2019.

CARBALLA, M.; REGUEIRO, L.; LEMA, J.M. Microbial management of anaerobic digestion: Exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 467 33, p.103–111, 2015.

CASTELLANO-HINOJOSA, A.; ARMATO, C.; POZO, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. New concepts in anaerobic digestion processes: recent advances and biological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 12, p. 5065–5076, 2018.

Catenacci, A., Santus, A., Malpei, F., Ferretti, G. Early prediction of BMP tests: A step response method for estimating first-order model parameters. *Renewable Energy*, v. 188, p. 184-194, 2022.

CHATILA, S.; AMPARO, M. R.; CARVALHO, L. S.; PENTEADO, E. D.; TOMITA ISN, SANTOS-NETO A.J, LIMA GOMES P.C.F.; ZAIAT, M. Sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal using a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. *Environ Technol*, v. 37, p.847–853, 2015.

CHEN, G.; YUE, P.L.; MUJUMDAR, A.S. Dewatering and drying of wastewater treatment sludge. *Handbook of Industrial Drying*. 3^a ed., CRC Press. 1312 p., 2006.

CHEN, S.; HE, J.; WANG, H.; DONG, B.; LI, N.; DAI, X. Microbial responses and metabolic pathways reveal the recovery mechanism of an anaerobic digestion system subjected to progressive inhibition by ammonia. *Chemical Engineering Journal*, v. 35, p. 312–323, 2018.

CHEN, W.; WANG, J.; LIU, W. A. View of Anaerobic Digestion: Microbiology, Advantages and Optimization. *Academic Journal of Environment & Earth Science*, v. 5(1), p. 1-8, 2023

CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n. 2, p. 152 – 161, 2005.

CHERNICHARO, C. A. L. Reatores anaeróbios. 2. ed., Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, Belo Horizonte, 380 p., 2007.

CHYNOWETH, D. P.; PULLAMMANAPPALLIL, P. C. Anaerobic digestion of municipal solid wastes. In: *Microbiology of Solid Waste*, Palmisano A.C. e Barlaz M.A. editors, v.1, p. 69, 2001.

CIRCLE ECONOMY. (2023). *The circularity gap report 2023* (pp. 1-64, Rep.). Amsterdam: Circle Economy.

CREMONEZ, Paulo André et al. Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 281, p. 111854, 2021.

COELHO, S. T. et al. *Sustentabilidade Ambiental dos Biocombustíveis. Biocombustíveis no Brasil: Fundamentos, Aplicações e Perspectivas*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Synergia, 2014.

COELHO, S.T.; GARCILASSO, V.P.; PACHECO, J.; ESCOBAR, J.F.; PERECIN, D.; AMARAL, A.C. *Geração de eletricidade a partir de biomassa no Brasil: Situação Atual, Perspectivas e Barreiras*. Editora LTC-GEN, Rio de Janeiro, 2ª Ed., 470 p., 2021.

CONTARDI, M.; RISTUCCIA, M.; RACCICHINI, A. *Cidades Inteligentes Sustentáveis: Inovações para a Transformação Urbana no Brasil*. Caderno FGV Projetos, Cidades Sustentáveis, ano 13, n. 32, 2018.

CONRAD, R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Advances*, v. 96, p.1–63, 2007.

CONRAD, Ralf; KLOSE, Melanie; ENRICH-PRAST, Alex. Acetate turnover and methanogenic pathways in Amazonian lake sediments. *Biogeosciences*, v. 17, n. 4, p. 1063-1069, 2020.

DE BAERE, L.; MATTHEEUWS, B. Anaerobic Digestion of Municipal Solid Waste in Europe. *BioCycle*, v. 51, n. 2, p. 24-26, 2020.

DE CRESCENZO, Carmen et al. Modelling of autogenerative high-pressure anaerobic digestion in a batch reactor for the production of pressurised biogas. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2022.

DE LIMA, E.; SILVA, M. R.; CORREA, R. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Microbial characterization of methanogenic iron-reducing consortium in reactors with polychlorinated biphenyls. *Curr Microbiol*, v. 75, p.666–676, 2018.

Deng, L., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D.D., Pandey, A., Varjani, S., Hoang, N. B. (2022). Recent advances in circular bioeconomy based clean technologies for sustainable environment. *J. Water Process Eng.* 46, 102534.

DE WIT M.; Hoogzaad, J.; Ramkumar, S.; Friedl, H.; Douma, A. *The Circularity Gap Report: An Analysis of the Circular State of the Global Economy*. Circle Economy: Amsterdam, The Netherlands, 2018.

DELFORNO, T.P.; MOURA, A. G. L.; OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Effect of biomass adaptation to the degradation of anionic surfactants in laundry wastewater using EGSB reactors. *Bioresour Technol*, v. 154, p. 114–121, 2014.

DEMIREL, B.; SCHERER, P.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Production of methane and hydrogen from biomass through conventional and high-rate anaerobic digestion processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 40, p. 116 – 146, 2010.

DENMAN, S. E.; TOMKINS, N. W.; McSWEENEY, C. S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 62, p. 313–322, 2007.

DE NARDI, I.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. *Water Sci Technol*, v. 45(10), p. 175–180, 2012.

DE VRIEZE, Jo. Methanosaeta vs. Methanosarcina in anaerobic digestion: the quest for enhanced biogas production. 2014. Tese de Doutorado. Ghent University.

DE VRIEZE, J.; MER, C.; WALRAEDT, D.; et al Microbial community redundancy in anaerobic digestion drives process recovery after salinity exposure. *Water Res*, v. 111, p.109–117, 2017.

DIEKERT, G.; WOHLFARTH, G. Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 66, p. 209–221, 1994.

DIVYA, D.; GOPINATH, L. R.; MERLIN CHRISTY, P. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means, *Renew. Sustain. Energy Rev*, v. 42, p. 690-699, 2015.

DONG, B.; YI, J.; DAI, L.; DAI, X. Evaluation of several DNA extraction methods for obtaining total community DNA from anaerobic digestion sludge. *Procedia Environmental Sciences*, v. 18, p. 856 – 863, 2018.

DONG, N. et al. Performance and microbial community of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic and extreme-thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, v. 266, p. 454–462, 2018.

DONOSO-BRAVO, A.; OLIVARES, D.; LESTY, Y.; BOSSCHE, H. Exploitation of the ADM1 in a XXI century wastewater resource recovery facility (WRRF): The case of codigestion and thermal hydrolysis. *Water Research*, v. 175, 2020.

DRIDI, B et al. Methanomassiliicoccus luminyensis a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 62, p. 1902–1907, 2012.

DYKSMA, Stefan; JANSEN, Lukas; GALLERT, Claudia. Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste. *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 105, 2020.

DWORKIN MM, FALKOW S, ROSENBERG E et al. The prokaryotes. In: *Archaea and bacteria: firmicutes*, vol 3. Actinomycetes. Springer, New York, NY, 2006.

EBA – EUROPEAN BIOGAS ASSOCIATION. Statistical Report 2022. Ed: European Biogas Association. Belgium. 2022

ELADAWY, A. 2005. Modelling of Anaerobic Sewage Sludge Digestion - Sludge Characterisation and Process Analysis. Austria: PhD Thesis. University of Innsbruck.

EL-MASHAD, H. M.; ZEEMAN, G.; VAN LOON, W. K.; BOT, G.; LETTINGA, G. Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, v. 95(2), p. 191–201, 2004.

ELBESHISHY, 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*, v. 110, p. 18–25, 2012.

ENZMANN, F.; MAYER, F.; ROTHER, M.; HOLTMANN, D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMB Express* v.8, 2018.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. Plano Decenal de Expansão de Energia 2030. Brasília: MME/EPE, 2021.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. Anuário Estatístico de Energia Elétrica 2021 ano base 2020. Brasília: MME/EPE, 2021. 255p.

ESPOSITO, G.; FRUNZO, L.; PANICO, A.; PIROZZI, F. Modelling the effect of the ORL and OFMSW particle size on the performance of an anaerobic co-digestion reactor. *Process Biochemistry*, v. 42(2), p. 557-565, 2011.

FENG, Y.; BEHRENDT, J.; WENDLAND, C.; OTTERPOHL, R. Implementation of the IWA anaerobic digestion model No.1 (ADM1) for simulating digestion of blackwater from vacuum toilets, *Water Science & Technology*, v. 53(9), p. 253–263, 2006.

FERGUSON, R. M. W.; COULON, F.; VILLA, R. Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD. *Sci. Total Environ.* V. 642, p.754–763, 2018.

FGV Projetos. Capital Natural, Serviços Ecosistêmicos e Inovação: Perspectivas e Oportunidades para o Brasil, n° 31. Ed: FGV, Rio de Janeiro. 2018.

FGV Projetos. BIOGÁS: INOVAÇÃO E SUSTENTABILIDADE PARA O SANEAMENTO BÁSICO, n° 33. Ed: FGV, Rio de Janeiro. 2019.

FILER, J.; DING, H. H.; CHANG, S. Biochemical methane potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. *Water*, 2019.

FLORES-OROZCO, D.; Rakesh Patidar, David Levin, Ayush Kumar, Richard Sparling, Nazim Cicek. 2023. Metagenomic analyses reveal that mesophilic anaerobic digestion substantially reduces the abundance of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in dairy manures. *Environmental Technology & Innovation*. V 30, 103128. ISSN 2352-1864

FNR – Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2009). Biogas- Messprogramm II – 61 Biogasanlagen im Vergleich, Gülzow, Germany, ISBN 978-3-9803927-8-5.

FORSTER-CARNEIRO, T.; PÉREZ, M.; ROMERO, L. I. Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 15, p. 6994-7002, 2008.

FOTIDIS, I. A.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. 2014. The dominant acetate degradation pathway/methanogenic composition in full-scale anaerobic digesters operating under different ammonia levels. *Int. Journal Environmental Science Technology*. 11, 2087–2094.

GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, v.6, p.205-226, 2020.

GARCÍA-GEN, S.; WOUWER, A. V. A model-based optimisation strategy for the start-up of anaerobic co-digestion processes. *Renewable Energy*, v. 170, p. 693–702, 2021.

GMEHLING, J.; KOLBE, B.; KLEIBER, M.; RAREY, J. 2012. *Chemical Thermodynamics for Process Simulation*. s.l.:Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA. ISBN: 978-3-527-31277-1.

GOHIL, S. N. et al. Methane from human excreta: Comparative assessment of batch and continuous biomethanation process. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v.12(4), p. 2143–2148, 2018.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T. Renewable energy – traditional biomass vs modern biomass. *Energy Policy*, v. 32, p. 711-714, 2014.

GOUX, X.; CALUSINSKA, M.; LEMAIGRE, S.; MARYNOWSKA, M.; KLOCKE, M.; UDELHOVEN, T.; BENIZRI, E.; DELFOSSE, P. 2015. Microbial community dynamics 524 in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology Biofuels* 8, 122.

Grosser, A., Neczaj, E., Jasinska, A., Celary, P. The influence of grease trap sludge sterilization on the performance of anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Renew. Energy*, v. 161, p. 988–997, 2020.

GÜLLERT, S.; FISCHER, M. A.; TURAEV, D.; NOEBAUER, B.; ILMBERGER, N.; WEMHEUER, B.; ALAWI, M.; RATTEI, T.; DANIEL, R.; SCHMITZ, R. A.; GRUNDHOFF, A.; STREIT, W. R. Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnol Biofuels*, v. 9, p.121, 2016.

Guo, W., Li, D., Zhang, Z., Mo R., Peng, Y., Li, Y. A novel approach for the fractionation of organic components and microbial degraders in ADM1 and model validation based on the methanogenic potential. *Water Research*, v. 236, 119945, 2023.

HAGEN, L.H.; FRANK, J.A.; ZAMANZADEH, M.; EIJSSINK, V.G.H.; POPE, P.B.; HORN, S.J.; ARNTZEN, M.O. Quantitative metaproteomics highlight the metabolic contributions of uncultured phylotypes in a thermophilic anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 83, e01955-16, 2017.

HAILU, Abrha Mulu et al. Insight into microbial community diversity and composition of two-stage anaerobic digestion: Focusing methanogenic stage. *Bioresource Technology Reports*, v. 15, p. 100764, 2021.

HANREICH, A.; SCHIMPF, U.; ZAKRZEWSKI, M.; SCHLUTER, A.; BENNDORF, D.; REICHL, U.; KLOCKE, M. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *System Applied Microbiology*, v. 36, p. 330-338, 2013.

HANSEN, T. L.; SCHMIDT, J. E.; ANGELIDAKI, I.; MARCA, E.; JANSEN, J. L. C.; MOSBÆK, H.; CHRISTENSEN, T. H. Method for Determination of Methane Potentials of Solid Organic Waste. *Waste Management*, v. 24, p. 393–400, 2004.

HAO, L.; BIZE, A.; CONTEAU, D., CHAPLEUR, O.; COURTOIS, S.; KROFF, P.; DESMOND-LE, E. Q.; BOUCHEZ, T.; MAZEAS, L. New insights into the key microbial phylotypes of anaerobic sludge digesters under different operational conditions. *Water Research*, v. 102, p.159-169, 2016.

HASSA, J., Maus, I., Off, S., Puhler, A., Scherer, P., Klocke, M., Schluter, A. Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 102, p. 5045–5063, 2018.

HE, Q.; LI, L.; PENG, X. Early Warning Indicators and microbial mechanisms for process failure due to organic overloading in food waste digesters. *J. Environ. Eng.*, v. 143, 04017077, 2017.

HIDAKA, Taira et al. Comparative anaerobic digestion of sewage sludge at different temperatures with and without heat pre-treatment. *Chemosphere*, v. 307, p. 135808, 2022.

HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Sci. Technol.*, v. 74, p. 2515–2522, 2016.

IEA – International Energy Agency. *Process monitoring in biogas plants*. London: IEA. 2013. 38p.

IEA – International Energy Agency. *Bioenergy Task 37: Country Reports Summaries*. London: IEA, 2019. 78p.

IEA – International Energy Agency. *Tracking clean energy innovation - A framework for using indicators to inform policy*. Paris: IEA, 2020.

IEA – International Energy Agency. *Renewables 2022: Analysis and forecast to 2027*. Paris: IEA, 2022.

ISO 11734, 1995. *Water quality – Evaluation of the “ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digester sludge – Method by measurement of the biogas production*. International Organization of Standardization, Switzerland.

-ISO 5667-13 (2011). Water quality - Sampling - Part 13: Guidance on sampling of sludges from sewage and water treatment works, ISO, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Issah, A. A., Kabera, T., Kemausuor, F. Biogas optimisation processes and effluent quality: A review. *Biomass Bioenergy*, v. 133, 105449, 2020.

-JENDE, O. et al. (Org). Barreiras e Propostas de Soluções para o Mercado de Biogás no Brasil. Probiogás. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, Ministério das Cidades, Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit GmbH (GIZ). Brasília, DF: Ministério das Cidades, 2016.

-JENKINS, S.R., MORGAN, J.M. AND SAWYER, C.L. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Water Pollut. Control Fed.* 55(5), 448-453.

JIANG, X. et al. Study on anaerobic co-digestion of municipal sewage sludge and fruit and vegetable wastes: Methane production, microbial community and three-dimension fluorescence excitation-emission matrix analysis. *Bioresour. Technol.*, v. 347, 126748, 2022.

JIMENEZ, J. et al. Modelling hydrolysis: simultaneous versus sequential biodegradation of the hydrolysable fractions. *Waste Manage.*, v. 101, p. 150–160, 2020.

JINGURA, R. M., KAMUSOKO, R. Methods for determination of biomethane potential of feedstocks: A review. *Biofuel Researc. J.*, v. 4, p. 573–586, 2017.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 8. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2017.

KAFLE, G. K., CHEN, L. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. *Waste Manag.*, v. 48, p. 492–502, 2016.

KALLISTOVA, A. Y.; MERKEL, A.Y.; TARNOVETSKII, I. Y.; PIMENOV, N. V. Methane formation and oxidation by prokaryotes. *Microbiology*, v. 86, p. 671–691, 2017.

KANG, H. J., Lee, S. H., Lim, T. G., Park, H. D. Effect of microbial community structure in inoculum on the stimulation of direct interspecies electron transfer for methanogenesis. *Bioresour. Technol.*, v. 332, 125100, 2021.

KANG, H.J et al. Recent advances in methanogenesis through direct interspecies electron transfer via conductive materials: A molecular microbiological perspective. *Bioresource technology*, v. 322, p. 124587, 2021.

KASHI, S., Satari, B., Lundin, M., Horváth, I. S., Othman, M. Application of a mixture design to identify the effects of substrates ratios and interactions on anaerobic co-digestion of municipal sludge, grease trap waste, and meat processing waste. *J. Environ. Chem. Eng.*, v. 5, p. 6156–6164, 2017.

KASINATH, Archana et al. Biomass in biogas production: Pretreatment and codigestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 150, p. 111509, 2021.

KAUFFMAN, S. A. 2019. *A World Beyond Physics: The Emergence and Evolution of Life*. Oxford University Press, USA. 168p.

KOCH, K., Hafner, S. D., Weinrich, S., Astals, S. Identification of Critical Problems in Biochemical Methane Potential (BMP) Tests From Methane Production Curves. *Frontiers Environ. Sci.* v. 7, p. 178, 2019.

KOWAL, Przemysław et al. Assessment of diversity and composition of bacterial community in sludge treatment reed bed systems. *Science of The Total Environment*, v. 756, p. 144060, 2021.

Kragelund C, Levantesi C, Borger A et al. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;59:671–82.

KUNDU, K. 2017. Influence of Process Parameters on Anaerobic Digestion Microbiome in Bioenergy Production: Towards an Improved Understanding. *Bioenergy Resources.* v.10:288–303, 2017.

LAVERGNE, C. et al. A need for a standardization in anaerobic digestion experiments? Let's get some insight from meta-analysis and multivariate analysis. *J. Environ. Manag.* v. 222, p. 141–147, 2018.

LETTINGA, G. The anaerobic treatment approach towards a more sustainable and robust environmental protection, *Water Science & Technology*, v. 152(1-2), p. 1-11, 2005.

LI, H. et al. Performance, granule conductivity and microbial community analysis of upflow anaerobic sludge blanket system (UASB) reactors from mesophilic to thermophilic operation. *Biochemical Engineering*, v. 133, p. 59–65, 2018.

LIM, J.W.; PARK, T.; TONG, Y.W.; YU, Z. The microbiome driving anaerobic digestion and microbial analysis. *Advances in Bioenergy*, v. 5, p. 1-61, 2020.

LIMA, H. Q. Determinação de parâmetros cinéticos do processo de digestão anaeróbia dos resíduos orgânicos de Santo André – SP por meio de testes do potencial bioquímico de metano. UFABC - Santo André/SP. 2016.

LIN, Q., De Vrieze, J., Li, C., Li, J., Li, J., Yao, M., Hedeneç, P., Li, H., Li, T., Rui, J., Frouz, J., Li, X. Temperature regulates deterministic processes and the succession of microbial interactions in anaerobic digestion process. *Water Res.*, v. 123, p. 134–143, 2017.

IINO, T.; TAMAKI, H.; TAMAZAWA, S. et al. *Candidatus Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. *Microbes Environ*, v. 28, p. 244–250, 2013.

LIU, C. et al. Improve biogas production from low-organic-content sludge through high-solids anaerobic co-digestion with food waste. *Bioresource Technology*, v. 219, p.252-260, 2016.

LIU, Y.; BEER, L.L.; WHITMAN, W.B. Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism. *Trends Microbiology*, v. 20, p.251–258, 2012.

LOHANI, Sunil Prasad et al. Modeling temperature effects in anaerobic digestion of domestic wastewater. *Water-Energy Nexus*, v. 1, n. 1, p. 56-60, 2018.

LOBATO, L. C. S. Aproveitamento energético de biogás gerado em reatores UASB tratando esgoto doméstico. 2021. 184 f. Tese (doutorado), Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

LUCAS, R. et al. Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015. v.91, p.1-11.

LUO, G. et al. New steady-state microbial community compositions and process performances in biogas reactors induced by temperature disturbances. *Biotechnology Biofuels*, v. 8, 3, 2015.

LOUCA, Stilianos et al. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature ecology & evolution*, v. 2, n. 6, p. 936-943, 2018.

MA, S. et al. Effect of mixing intensity on hydrolysis and acidification of sewage sludge in two-stage anaerobic digestion: Characteristics of dissolved organic matter and the key microorganisms. *Water Research*, v.148, p. 359-367, 2019.

Ma, Z., Wang, R., Song, G., Zhang, K., Zhao, Z., & Wang, J. Interpretable ensemble prediction for anaerobic digestion performance of hydrothermal carbonization wastewater. *Science of The Total Environment*, v. 908, 168279, 2024.

MAHLA, P. K. et al. Biomethanation: Advancements for Upgrading Biomethane Using Biogas Technologies. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, p. 487-504, 2022.

MAHARAJ, B. C., Mattei, M. R., Frunzo, L., Hullebusch, E. D. va., Esposito, G. ADM1 based mathematical model of trace element complexation in anaerobic digestion processes. *Bioresour. Technol.*, v. 276, p. 253–259, 2019.

MARAGKAKI, A. E. et al. Improving biogas production from anaerobic co-digestion of sewage sludge with a thermal dried mixture of food waste, cheese whey and olive mill wastewater. *Waste Manag.*, v.71, p. 644–651, 2018.

MACHADO, M. F. de S. A situação brasileira dos biossólidos. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil. Campinas, 2021.

MAGALHÃES, G. V. V. Avaliação da biodigestão anaeróbia de resíduos orgânicos: ensaio potencial bioquímico de metano (BMP) e projeto piloto de um biodigestor em escala real. 2018. 131f. Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará.

MACIEL, F. J.; JUCÁ, J. F. T. Evaluation of landfill gas production and emissions in a MSW large-scale experimental cell in Brazil. *Waste Management*, v. 31, n. 5, p. 966-977, 2011.

MAO, C. L.; WANG, X. J.; XI, J. C.; FENG, Y. Z.; REN, G.X. Linkage of kinetic parameters with process parameters and operational conditions during anaerobic digestion. *Energy*, v. 135, p. 352–360, 2017.

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

MATA-ALVAREZ J. (2003). Fundamentals of the anaerobic digestion process. in: biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes, Mata-Alvarez J. Editor, IWA Publishing, 1-18.

MARTIN, W.; BAROSS, J.; KELLEY, D.; RUSSELL, M. J. Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Review Microbiology*, v. 6, p.805, 2008.

Mayer, F., Gerin, P. A., Noo, A., Foucart, G., Flammang, J., Lemaigre, S., Sinnaeve, G., Dardenne, P., Delfosse, P. Assessment of factors influencing the biomethane yield of maize silages. *Bioresour. Technol.*, v.153, p. 260-268, 2014.

McCarty, P. L. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public works*, 95(9), 107-112.

METCALF, L.; EDDY, H. P. Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. 5ª ed., McGraw Hill Brasil, 2008 p., 2017.

-MME/EPE. Plano Nacional de Energia 2050. Brasília: [s. n.], 2020.

MIRANDA et al, 2020

MONDAV, R. et al. Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nat Commun*, v. 5, p. 3212, 2014.

MONTEGGIA, L. Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro Atividade Metanogênica Específica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. 1997.

MORRIS, B. et al. Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiol Rev*, v. 37, p. 384–406, 2013.

Moissl-Eichinger C. et al. Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends Microbiol*, v. 26, p. 70–85, 2018.

MU, S. J. et al. Simulation and control of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor using an ADM1-based distributed parameter model, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 46, p. 1519-1526, 2007.

MU, S. J. et al. Anaerobic digestion model No. 1 based distributed parameter model of anaerobic reactor: I. model development. *Bioresource Technology*, v. 99(9), p. 3665-3675, 2008.

Mustapha, N. A. et al. Seeking key microorganisms for enhancing methane production in anaerobic digestion of waste sewage sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 102, p. 5323–5334, 2018.

MUYZER, G.; de WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p.695–700, 1993.

NA, J. G. et al. Microbial community analysis of anaerobic granules in phenol degrading UASB by next generation sequencing. *Biochemical Engineering Journal*, v. 112, p. 241–248, 2016.

NABATEREGA, R. et al. Modification and calibration of anaerobic digestion model 1 to simulate volatile fatty acids production during fermentation of municipal sludge. *Biochemical Engineering Journal*, v. 194, p. 108886, 2023.

Naghavi, R. et al. Determining the appropriate mixing ratio in a multi-substrate anaerobic digestion of organic solid wastes employing Taguchi method. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 20(1), p. 545-554, 2022.

NAKAYAMA

NIE, Erqi et al. How does temperature regulate anaerobic digestion? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 150, p. 111453, 2021.

NIERYCHLO, Marta et al. The morphology and metabolic potential of the Chloroflexi in full-scale activated sludge wastewater treatment plants. *FEMS microbiology ecology*, v. 95, n. 2, p. fiy228, 2019.

OYEWOLE, O. A. Biogas production from chicken droppings. *Sci Wor J*, v. 5 (4), p. 11–4, 2010.

OWEN, W. F.; STUCKEY, D. C.; HEALY, J. B.; YOUNG, L.Y.; MCCARTY, P. L. Bioassay for Monitoring Biochemical Methane Potential and Anaerobic Toxicity. *Water Res.*, v. 13, p. 485–492, 1979

OZGUN, Hale. Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) for mathematical modeling of full-scale sludge digester performance in a municipal wastewater treatment plant. *Biodegradation*, v. 30, n. 1, p. 27-36, 2019.

PACE, N. R. et al. The Analysis of Natural Microbial-Populations by Ribosomal-Rna Sequences. *Adv Microb Ecol.*, v. 9, p.1-55, 1986.

PAOLINI, V. et al. 2018. Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresource Technology*, v.110, p. 18–25, 2012.

PAN, X. et al. Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. *Water research*, v. 190, p. 116774, 2021.

PAN, Y. et al. Synergistic effect and biodegradation kinetics of sewage sludge and food waste mesophilic anaerobic co-digestion and the underlying stimulation mechanisms. *Fuel*, v. 253, p. 40–49, 2019.

PARK, M. et al. Optimization and comparison of methane production and residual characteristics in mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge by hydrothermal treatment. *Chemosphere*, v. 264, 128516, 2021.

PARKER, W. J. Application of ADM1 model to advanced anaerobic digestion, *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1832-1842, 2005.

PEARSE, L. F. et al. A new biochemical methane potential assay for landfilled waste using the organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol. Reports*, v. 12, 100579, 2020.

PEÑA-VARON, M. R. (2002). Advanced primary treatment of domestic wastewater in tropical countries: development of high-rate anaerobic ponds, Ph.D thesis, School of Civil Engineering, University of Leeds, UK.

PERECIN, D. Comparação entre as estratégias de aproveitamento energético do biogás: geração de energia elétrica versus produção de biometano. 2017. 164f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Energia e Meio Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

PEREIRA, M. A. A. S. 2003. Anaerobic biodegradation of long chain fatty acids, Ph.D. Thesis, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal.

PHAM, C. H. et al. Validation and Recommendation of Methods to Measure Biogas Production Potential of Animal Manure. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* v, 26, p. 864–873, 2013.

PILARSKI, K. et al. The efficiency of industrial and laboratory anaerobic digesters of organic substrates: The use of the biochemical methane potential correction coefficient. *Energies.*, v. 13, p. 1280, 2020.

PROBIOGAS, 2015. Catálogo de tecnologias e empresas de biogás. 1a Edição Ministério das Cidades Brasília, 2015.

PROBIOGÁS. Barreiras e Propostas de Soluções para o Mercado de Biogás no Brasil. Brasília: GIZ, 2016.

QUEEN, A. S. (2006). Simulador de reatores anaeróbios com base no ADM1, Dissertação de mestrado, Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Brasil.

RAPOSO, F. et al. Predictive regression models for biochemical methane potential tests of biomass samples: Pitfalls and challenges of laboratory measurements. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, v. 127, 109890, 2020.

RAPOSO, A. et al. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: Na overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and sustainable energy reviews.* v.16, p.861-877, 2012.

RAPOSO, F. et al. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 86 (8), p. 1088–1098, 2011.

RODRIGUES, R. P. et al. Comparative analysis of methods and models for predicting biochemical methane potential of various organic substrates. *Sci. Total Environ.*, v. 649, p.1599–1608, 2019.

REN, N. Q. et al. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 9, p. 1774-1780, 2007.

REN – RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY. *Energias Renováveis 2018 – Relatório da Situação Mundial*. 326p. 2018.

RIEKE, C. et al. Modeling and optimization of a biogas plant for a demand-driven energy supply. *Energy*, v. 145, p. 657-664, 2018.

RIPOLL V, Agabo-García C, Perez, M, Solera R. 2020. Improvement of biomethane potential of sewage sludge anaerobic co-digestion by addition of “sherry-wine” distillery wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 251: 119667.

RUIZ, G.; ROCA. E.; LEMA, J.M. (2002). Selección de variables para la identificación de estados estacionarios en la operación de reactores anaeróbios, VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia, Mérida, México, 166-172.

SADEGHIAN, O. et al. A comprehensive review on energy saving options and saving potential in low voltage electricity distribution networks: Building and public lighting. *Sustainable Cities and Society*, v. 72, 103064, 2021.

SAIA, F. T. et al. Archaea diversity in Brazilian aquatic ecosystems. In: *Archaea structure habitats ecological significance*. *Nov Sci Publ*, v. , p. 95–120, 2011.

SAKAI, S. et al. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘Rice Cluster I’, and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 58, p. 929–936, 2008.

SALOMON, K. R. *Avaliação Técnico-Econômica e Ambiental da Utilização do Biogás Proveniente da Biodigestão da Vinhaça em Tecnologias para Geração de Eletricidade*. 2007. 219 f. Tese (doutorado em engenharia mecânica), Programa de pós-graduação em engenharia mecânica, Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.

SANJAYA, A. et al. Kinetic study on the effects of elevated temperature and micro aeration in volatile fatty acids production by anaerobic fermentation of alkaline-pretreated oil palm empty fruit bunch. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 11, n. 3, p. 110163, 2023.

SANT’ANNA JUNIOR, G. L. 2010. *Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro. Interciência. 418p.

SAPPL, J., HARDERS, M., RAUCH, W. Machine learning for quantile regression of biogas production rates in anaerobic digesters. *Sci. Total Environ.*, v. 872, 161923, 2023.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J. F.; FAHL, F. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renewable Energy*, n. 129, p. 457-472, 2018.

SHAYAN, S. I. et al. Dynamic model of algal-bacterial shortcut nitrogen removal in photo-sequencing batch reactors. *Algal Research*, v. 64, p. 102688, 2022.

SCHIMADA, T. et al. Carbohydrate storage in anaerobic sequencing batch reactors. *Water Research*, v. 41(20), p. 4721-4729, 2007.

SCHOEN, M. et al. Population dynamics at digester overload conditions. *Bioresource Technology*, v. 100(23), p. 5648-5655, 2009.

SCHNÜRER, Anna; JARVIS, Åsa. *Microbiology of the biogas process*. Swedish university of agricultural sciences, 2018.

SEGHEZZO, L., et al. A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactor. *Bioresour Technol*, v. 65, p. 175–190, 1998.

SEMRAU, J. D. Current knowledge of microbial community structures in landfills and its cover soils. *Applied Microbiol Biotechnol*, v. 89, p. 961–969, 2021.

SILLERO, L., SOLERA, R., PEREZ, M. Improvement of the anaerobic digestion of sewage sludge by co-digestion with wine vinasse and poultry manure: Effect of different hydraulic retention times. *Fuel*, v. 321, 124104, 2022.

SILLERO, L., SOLERA, R., PEREZ, M. Biochemical assays of potential methane to test biogas production from dark fermentation of sewage sludge and agricultural residues. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 47, n. 27, p. 13289-13299, 2022.

SILLERO, L., SOLERA, R., PEREZ, M. Effect of temperature on biohydrogen and biomethane production using a biochemical potential test with different mixtures of sewage sludge, vinasse and poultry manure. *Journal of Cleaner Production*, v. 382, p. 135237, 2023.

SILVA, W. R. Estudo cinético do processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos vegetais. 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. 159 f.

-SILVA, M. F. D. O.; Pereira, F. D. S.; Martins, J. V. B. A Bioeconomia Brasileira em Números. *Bioeconomia, BNDES Setorial* n° 47, pp. 277-332, 2018.

SILVA, F.; BILÉ, M.; RODRIGUES, A.; NADAIS, H.; ARROJA, L.; CAPELA, I. 2007. Avaliação do comportamento de um digestor anaeróbio para o tratamento do condensado gerado numa fábrica de pasta de papel. 9ª Conferência Nacional do Ambiente, Universidade de Aveiro, Portugal. 669-676.

SILVA, M. C. P. Avaliação de lodo anaeróbio e dejetos bovinos como potenciais inóculos para partida de digestores anaeróbios de resíduos alimentares. Dissertação de Mestrado Programa de

Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

SILVA NETO, J. V. et al. ADM1 approach to the performance optimization and biogas H₂S prediction of a large-scale anaerobic reactor fed on sugarcane vinasse. *Water Science and Technology*, v. 80, n. 9, p. 1774-1786, 2019.

SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos. 2022. SNSA/MCIDADES, Ministério das Cidades, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, Brasília.

SNIS. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, 2023.

SNIS. Diagnóstico do Manejo de Resíduos Sólidos Urbanos. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, 2022.

SOROKIN, D. Y. et al. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nat Microbiol*, v. 2, 1708, 2017.

SPANG, A.; CACERES, E. F.; ETTEMA, T. J. G. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science*, v. 357(80), 3883, 2017.

STALEY, B. F; REYES, F. L; BARLAZ, M. A. Effect of spatial differences in microbial activity, pH, and substrate levels on methanogenesis initiation in refuse. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 77, n. 7, p. 2381–2391, 2011.

SUN, Jiaji et al. Carbon, iron, and polymer-based conductive materials for improving methane production in anaerobic wastewater treatment systems: A review on their direct interspecific electron transfer mechanism. *Fuel*, v. 342, p. 127703, 2023.

SUN, Kai et al. Microbial communities related to the sulfur cycle in the Sansha Yongle Blue Hole. *Microbiology Spectrum*, v. 11, n. 5, p. e01149-23, 2023.

SURENDRA, K. C.; TAKARA, D.; HASHIMOTO, A. G. Biogas as a sustainable energy source for developing countries: opportunities and challenges. *Renew Sust Energ Rev.*, v.31, p.46– 59, 2014.

SZARKA, N.; SCHOLWIN, F.; TROMMLER, M. A novel role for bioenergy: a flexible, demand-oriented power supply. *Energy*, v. 61, p.18–26, 2013.

TAKAI, K. et al. Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci*, v. 105, p. 10949–10954, 2008.

THAUER, R. K.; KASTER A-K.; SEEDORF, H. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, p. 579–591, 2008.

TREU, L. et al. Deeper insight into the structure of the anaerobic digestion microbial community; the biogas microbiome database is expanded with 157 new genomes. *Bioresource Technology*, v. 216, p. 260–266, 2016.

TSAPEKOS, P. et al. Enhancing anaerobic digestion of agricultural residues by microaerobic conditions. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 11, p. 2325-2333, 2021.

UEN, T.S.; RODRÍGUEZ, L. F. An integrated approach for sustainable food waste management towards renewable resource production and GHG reduction. *Journal of Cleaner Production*, v. 412, 137251. 2023.

URTNOWSKI-MORIN, C. et al. Upgrading waste material flow analysis with process models: The case of anaerobic digestion. *J. Clean. Prod.*, v. 298, 126695, 2021.

VAN HAANDEL, A.C., LETTINGA, G. (1994). *Anaerobic Sewage Treatment – A practical guide for regions with a hot climate*, John Wiley & Sons, UK.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M. et al. *Experimental Methods in Wastewater Treatment*. IWA Publishing. 2017.

VAN WOLFEREN, M. et al. The Cell Biology of Archaea. *Nat Microbiol.*, v. 7(11), p. 1744–1755, 2022.

VASCO-CORREA, J. et al. Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. *Bioresour. Technol*, v. 247, p. 1015–1026, 2018.

VENKATESH, G.; RASHID, A. E. Economic-environmental analysis of handling biogas from sewage sludge digesters in WWTPs for energy recovery: Case study of Bekkelaget WWTP in Oslo (Norway). *Energy*, v.58, p. 220–235, 2023.

VENKITESHWARAN, K. et al. Relating anaerobic digestion microbial community and process function. *Microbiol Insights* 8 (Suppl 2): 37–44. 2016.

VDI - Handbuch Landwirtschaft/Landtechnik, 2006. Fermentation of Organic materials, German guideline, ISC 13.030.30, 27.190.

VOLSCHAN JR., I. *Tecnologias de tratamento de lodo. Notas de aula. Escola Politécnica, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.*

VOLSCHAN JR, I., DE ALMEIDA, R., CAMMAROTA, M. C. A review of sludge pretreatment methods and co-digestion to boost biogas production and energy self-sufficiency in wastewater treatment plants. *J. Water Process Eng.*, v. 40, 101857, 2021.

VON SPERLING, M. V. Princípio do tratamento biológico de águas residuárias. In: *introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 2005.

WANDERA, S. M. et al. The correlation of methanogenic communities' dynamics and process performance of anaerobic digestion of thermal hydrolyzed sludge at short hydraulic retention times. *Bioresource Technology*, v. 272, p. 180–187, 2019.

WANG, J. et al. Trophic link between syntrophic acetogens and homoacetogens during the anaerobic acidogenic fermentation of sewage sludge. *Biochem Eng J.*, v. 70, p. 1–8, 2013.

WANG, J. et al. Enhanced solubilization and biochemical methane potential of waste activated sludge by combined free nitrous acid and potassium ferrate pretreatment. *Bioresour. Technol.*, v. 297, 122376, 2020.

WANG, K. et al. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculums: effect of pH. *Bioresour. Technol.*, v. 161, p. 395-401, 2014.

WANG, P. et al. Do microbial communities in an anaerobic bioreactor change with continuous feeding sludge into a full-scale anaerobic digestion system? *Bioresour. Technol.*, v. 249, p. 89–98, 2018.

WBA. Global Bioenergy Statistics 2018. World Bioenergy Association, 2018.

WBA. Global Bioenergy Statistics 2019. World Bioenergy Association, 2019.

WEINRICH, S.; NELLES, M. Systematic simplification of the Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) – Model development and stoichiometric analysis. *Bioresour. Technol.*, v. 333, 125124, 2021.

WEISS, Madeline C. et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature microbiology*, v. 1, n. 9, p. 1-8, 2016.

WELLINGER, A.; MURPHY, J.; BAXTER, D. The biogas handbook: Science, production and applications. Woodhead Publishing Series in Energy: Number 52. 2013.

WERNER, J. J. et al. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proc Natl Acad Sci*, v. 108, p.41–63, 2011.

WESTERHOLM, Maria; DOLFING, Jan; SCHNÜRER, Anna. Growth characteristics and thermodynamics of syntrophic acetate oxidizers. *Environmental science & technology*, v. 53, n. 9, p. 5512-5520, 2019.

WESTERHOLM, Maria; SCHNÜRER, Anna. Microbial responses to different operating practices for biogas production systems. *Anaerobic digestion*, p. 1-36, 2019.

WICKHAM, R. et al. Anaerobic digestion of soft drink beverage waste and sewage sludge. *Bioresour. Technol.*, v. 262, p. 141-147, 2018.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic Structure of Prokaryotic Domain - Primary Kingdoms. *Proc Natl Acad Sci*, v. 74, p. 5088-5090, 1977

WBA - World Biogas Association. Global Potential of Biogas. London: World Biogas Association. 2019. 56p.

WBA - World Biogas Association. Biogas: Pathways to 2030. London: World Biogas Association. 202. 128p.

XIE S, Li X, Wang C, Kulandaivelu J, Jiang G. 2020. Enhanced anaerobic digestion of primary sludge with additives: Performance and mechanisms. *Bioresource Technology*, 316: 123970.

YAN, Z.; FERRY, J. G. Electron bifurcation and confurcation in methanogenesis and reverse methanogenesis. *Front Microbiol*, v. 9, 1322, 2018.

YI, J. et al. Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. *PLoS ONE*, v. 9 (7), e102548, 2014.

YIN, D. M. An explanation of the methanogenic pathway for methane production in anaerobic digestion of nitrogen-rich materials under mesophilic and thermophilic conditions. *Bioresource Technology* v. 264, 42–50, 2018.

YU, L. et al. Experimental and modelling study of a two-stage pilot scale high solid anaerobic digester system. *Bioresource Technology*, v. 124, p. 8-17, 2012.

ZAN, F. et al. Food waste-wastewater-energy/resource nexus: Integrating food waste management with wastewater treatment towards urban sustainability. *Water Res.*, v. 211, 118089, 2022.

ZHANG, Q., HU, J., LEE, D. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renew. Energy.*, v. 98, p. 108-119, 2016.

ZHANG W, Wei Q, Wu S, Qi D, Li W, Zuo Z, Dong R. 2014. Batch anaerobic co-digestion of pig manure with dewatered sewage sludge under mesophilic conditions. *Applied energy*, 128: 175-183.

ZHANG, Lei et al. Sediment bacterial community structure under the influence of different domestic sewage types. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 9, p. 1355, 2020.

ZHAO, X. et al. Modified Anaerobic Digestion Model No. 1 for modeling methane production from food waste in batch and semi-continuous anaerobic digestions. *Bioresour. Technol.*, v. 271, p. 109–117, 2019.

ZOU, H. et al. Mesophilic anaerobic co-digestion of residual sludge with different lignocellulosic wastes in the batch digester. *Bioresour. Technol.*, v. 268, p. 371–381, 2018.

ZUMSTEIN, E.; MOLETTA, R.; GODON, J. J. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol.*, v.2, p. 69–78, 2000.

ANEXO 1



Analysis of biogas production from sewage sludge combining BMP experimental assays and the ADM1 model

Mariana Erthal Rocha^{1,2}, Thais Carvalho Lazarino¹, Gabriel Oliveira¹, Lia Teixeira², Marcia Marques² and Norberto Mangiacchi¹

¹ Department of Mechanical Engineering, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

² Department of Sanitary and Environmental Engineering, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ABSTRACT

The Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) was employed to simulate methane (CH₄) production in an anaerobic reactor (AR), and the associated bench-scale biochemical methane potential (BMP) assay, having sewage sludge (SWS) from a municipal wastewater treatment plant (WWTP) as feedstock. The SWS presented the following physical-chemical characteristics: pH (7.4–7.6), alkalinity (2,382 ± 100 mg CaCO₃ L⁻¹), tCOD (21,903 ± 1,000 mg L⁻¹), TOC (895 ± 100 mg L⁻¹), TS, TVS, and VSS (2.0%, 1.1%, and 0.8%, respectively). The BMP assay was conducted in six replicates under anaerobic mesophilic conditions (37 ± 0.1°C) for 11 days with a CH₄ yield registered of 137.6 ± 6.39 NmL CH₄ or 124 ± 6.72 CH₄ g⁻¹ VS⁻¹. When the results obtained with the BMP bench-scale reactors were compared to the output generated with computational data by the ADM1 model having as input data the same initial sewage tCOD, similar cumulative CH₄ production curves were obtained, indicating the accuracy of the ADM1 model. This approach allowed the characterization of the sludge and estimation of its biogas production potential. The combination of BMP assays, experimental data, and ADM1 model simulations provided a framework for studying anaerobic digestion (AD) processes.

Subjects Bioengineering, Biotechnology, Environmental Impacts

Keywords Anaerobic digestion, Biochemical methane potential, Wastewater treatment plant, ADM1, Bioenergy, Sewage sludge

INTRODUCTION

Renewable energy plays a strategic role for energy security worldwide, since the main energy sources currently used are based on fossil fuels petroleum and coal, which are not renewable and pollute the environment (*Chen et al., 2018; Vasco-Correa et al., 2018; Sillero, Solera & Perez, 2022*).

Increasing amounts of sewage sludge (SWS) are generated all over the world at wastewater treatment plants (WWTPs) and its sustainable management is an important issue due to economic, environmental, and human health concerns (*Zan et al., 2022; Ma et al., 2019*).

Submitted 5 June 2023
Accepted 4 December 2023
Published 15 January 2024

Corresponding authors

Mariana Erthal Rocha,
marianaerthalrocha@gmail.com
Marcia Marques,
marciamarques@eng.uerj.br

Academic editor

Omar Gonzalez-Ortega

Additional Information and
Declarations can be found on
page 24

DOI 10.7717/peerj.16720

© Copyright
2024 Rocha et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Anaerobic digestion (AD) is a well-known complex microbial process in which organic waste, including SWS, is converted into bioenergy. This process integrates the set of waste management biotechnologies employing a diverse consortium of microorganisms (MO) to convert organic residues into CH₄-rich biogas ([Angelidaki et al., 2018](#)). AD of SWS is considered a relevant decarbonization process worldwide.

Producing and collecting CH₄ from SWS reduces water pollution and CH₄ emissions to the atmosphere ([Jiang et al., 2022](#)), meanwhile using this renewable source of energy contributes to saving environmental resources ([Deng et al., 2022](#)). However, the application of this approach in an industrial scale requires evaluation of biomass production and conversion systems, including feedstock selection and growth; harvest; storage conditions; bio-gasification; gas cleaning; gas use and residue processing ([Volschan Junior, de Almeida & Cammarota, 2021](#)).

The development of highly accurate mathematical models is currently a focal point in research efforts, as these models can effectively assess digester performance capabilities ([Achinas & Euverink, 2016](#)).

The current state-of-the-art model, the Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) was originally developed by the International Water Association—IWA Task Group ([Batstone et al., 2002](#)). The model was further improved resulting in the BSM2 version ([Alex et al., 2019](#); [Donoso-Bravo et al., 2020](#)), the xp version, among others. One of the key points for successful application of mathematical models to describe a particular bioprocess is achieving adequate input characterization ([Batstone et al., 2002](#)). In this scenario extensive model calibration procedures are required to improve accuracy and sensitivity ([Weinrich & Nelles, 2021](#)). Mechanistic models have in common that they need to be carefully calibrated ([Sapfl, Harders & Rauch, 2023](#)). Computational simulation (CS) evaluates the different processes and operation variables on the performance of the CH₄ biogas production in AD ([Jimenez et al., 2020](#); [Batstone & Virdis, 2014](#); [Batstone et al., 2015](#)). The ADM1 model has been used by several modelling studies in sewage AD ([Guo et al., 2023](#); [García-Gen & Wouwer, 2021](#); [Maharaj et al., 2019](#); [Urtnowski-Morin et al., 2021](#); [Zhao et al., 2019](#)).

The biochemical methane potential (BMP) assay has been widely used to test the anaerobic degradability of different organic wastes, and it is considered a suitable method to compare the degradability of different substrates ([Lavergne et al., 2018](#)). This test enables the assessment of the decomposability and the CH₄ conversion efficiency of diverse organic materials. [Owen et al. \(1979\)](#) initially introduced the BMP test, outlining a procedure to ascertain the decomposability of a substrate by monitoring the cumulative CH₄ production from an anaerobically incubated sample over a period of time ([Cabbai et al., 2013](#); [Elbeshbishy, Nakhla & Hafez, 2012](#); [Kafle & Chen, 2016](#); [Raposo et al., 2011](#); [VDI 4630, 2016](#)). However, the results obtained for the same substrate often differ among laboratories and much work to standardize such tests is still demanded ([Astals et al., 2013](#); [Filer, Ding & Chang, 2019](#); [Grosser, 2018](#); [Raposo, Borja & Ibelli-Bianco, 2020](#); [Strömberg, Nistor & Liu, 2014](#)). The German VDI 4630 ([VDI 4630, 2016](#)) is a BMP guideline that discusses the typical shape of methanogenic curves. However, the guideline presents only hypothetical idealized curves and does not discuss actual measurements, being not clear what might actually cause each response ([Koch et al., 2019](#)). According to [Filer, Ding](#)

Table 1 BMP experiments operational parameters.

| Operation | Unity | BMP assays |
|----------------|-------|---------------|
| Temperature | °C | 37 ± 0.1 |
| Stir | – | Twice daily |
| Total volume | mL | 250 |
| Working volume | mL | 100 |
| Substrate | mL | Sewage sludge |
| Inoculum | mL | Sewage sludge |
| I/S ratio | v/v | 1:1 |

& Chang (2019) because of the lack of a standardized protocol, there have been serious drawbacks impacting the industry users, as the reliability of generated information could be questioned, due to the potential effects laboratory-specific experimental and operational conditions, as well as data presentation on the results, limiting the comparability of published results. During the years several authors have worked to improve the BMP method (Angelidaki et al., 2009; Pearse, Hettiaratchi & Da Costa, 2020; Rodrigues et al., 2019; Wang et al., 2020). Numerical prediction methods using initial data acquired from conventional bench-scale BMP assays were recently proposed (Catenacci et al., 2022; Guo et al., 2023; Nabaterega, Nazyab & Eskicioglu, 2023). However, the BMP method is still undergoing evolution, and researchers are investigating crucial aspects to further mitigate potential sources of bias.

In the present study, we developed a methodology that combines biochemical methane potential (BMP) assays and total chemical oxygen demand (tCOD) data with a computational simulator, employing the BSM2 version of the ADM1 model (Alex et al., 2019), for the coupled full-scale anaerobic reactor (AR) and the BMP assay systems. By doing so, we were able to generate a comprehensive and detailed view of the AR processes, including a description of the inflow and outflow SWS compositions. This methodology can be applied to analyze the biogas production and the underlying processes in full/real-scale applications.

MATERIALS & METHODS

Sampling and samples characterization

Samples of SWS were collected from an active anaerobic digester at a large municipal WWTP located in Rio de Janeiro, Brazil. The WWTP has a treatment capacity of 7,400 m³day⁻¹ and a hydraulic retention time (HRT) of the AR is 28 days. It treats 2.5 m³s⁻¹ of wastewater and serves a population equivalent to 1.5 million inhabitants. Standard methods (APHA, 2017) were used to measure physicochemical parameters.

The operational parameters applied to the BMP assay are shown in Table 1.

The initial and final pH values were measured using an MS Tecnopon model Mpa210 meter, and temperature levels were recorded with a digital thermometer. Chemical oxygen demand (COD) was determined using a Shimadzu UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer, while alkalinity was measured *via* potentiometric titration. Total Solids (TS), total fixed

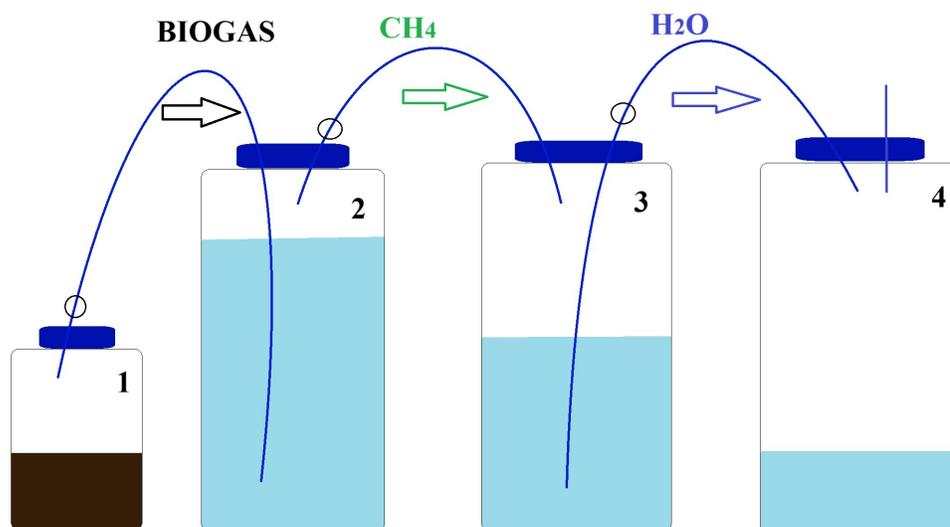


Figure 1 Schematic diagram of BMP apparatus used in BMP assay. Vessel 1 is the BMP reactor, vessel 2 contains a 3 M NaOH scrubbing solution, vessel 3 contains 1 M NaCl saline solution. Vessel 4 is initially empty and collects the saline solution displaced by the CH₄ gas collected in vessel 3.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.16720/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.16720/fig-1)

solids (TFS), total volatile solids (TVS), volatile suspended solids (VSS) were quantified using a gravimetric method with the analytical scale Gehaka AG200 (Gehaka, Sao Paulo, Brazil). Total organic carbon (TOC) analyses were carried out using a Shimadzu Total Organic Carbon Analyzer TOC 5000A (Shimadzu, Kyoto, Japan). Both inoculum and substrate, approximately 100 mL in total, were employed for the BMP assays with SWS as per the recommendation by *VDI 4630 (2016)*.

BMP assays: experimental procedure

The BPM assay was carried out according to previous studies by *Angelidaki et al. (2009)* and the German Guideline for Fermentation of Organic Materials (*VDI 4630, 2016*), in order to evaluate CH₄ production from sewage sludge SWS in bench-scale.

The experiment was conducted in six replicates R1–R6 ($n = 6$) incubated during 11 days under mesophilic conditions (37 ± 0.1 °C) using water-bath with digestion bottles of 250 mL total volume and 100 mL working volume (*Fig. 1*).

The BMP assay was carried out using four borosilicate Schott bottles (*Fig. 1*), chosen for their ability to withstand high temperatures and pressures. The first bottle in the sequence, referred to as the digester bottle (*Fig. 1*), featured pipes that had no contact with the inoculum, only with the gases produced. The second bottle was filled with a NaOH solution which served as a barrier to retain CO₂. The cannula was submerged in this basic solution as the gases generated in the digestion process were bubbled through it. The third bottle contained 1 L of a saturated NaCl solution and was equipped with a silicone stopper fitted with two 3-way taps. One tap was connected to the second bottle containing the alkaline solution, while the other tap was linked to the fourth bottle, which measured the displaced water volume.

To prevent gas leakage from the digesters, caps and connectors were securely sealed using high vacuum grease. In order to eliminate any existing O_2 in the system, N_2 gas was flushed into the headspace of the bottles for a period of 2 min. For bottle sealing, silicone stoppers with two holes each were employed. Two 3-way faucets were then inserted into the tops of these silicone stoppers, enabling external connections to the system. The analysis of gas volume produced during the experiment continued until the cumulative gas curve reached a plateau.

The sealing of the biodigester system was checked using a high-pressure pump, a differential dual port piezoresistive pressure transducer MPX5050DP, a Fluke multimeter, and an Arduino data logger. The bottles were gently shaken manually every day to prevent particle retention and system clogging.

This experimental setup allowed for precise measurements and ensured the integrity of the gas samples throughout the BMP assay.

ADM1 model

The Anaerobic Digestion Model 1 (ADM1) is the quasi-industry standard for modelling the AD processes that result in CH_4 production from wastewater (Allen et al., 2023). It was developed by the International Water Association (IWA) and is based on several simpler AD models. It considers a continuously stirred tank reactor containing wastewater and 12 different bacterial groups that consume/produce 12 different substrates. This scenario is described by a system of 24 ordinary differential equations (ODEs). The model also considers physio-chemical reactions within the substrate itself, increasing the number of substrates to 23 and increasing the total number of state variables to 35. These physio-chemical reactions are classified into two categories: acid-base reactions and liquid-gas exchange, both of which can be modelled by ODEs, resulting in the total system being described by 35 ODEs.

In this work, the Benchmark Simulation Model 2 (BSM2), (Alex et al., 2019), which is a modified version of the IWA ADM1 model (Batstone et al., 2002), is employed. The model comprises two extracellular stages, namely disintegration and hydrolysis, and three intracellular stages: acidogenesis or fermentation, acetogenesis, and methanogenesis. The extracellular stages were modeled using first-order kinetics. In this work we will use, interchangeably, the variables and model parameters naming notation employed by Alex et al. (2019), and Batstone et al. (2002), and Allen et al. (2023). For instance, complex composite concentration will be represented interchangeably by X_c or $X_{_c}$.

Initially, $X_{_c}$ was disintegrated into $X_{_ch}$, $X_{_pr}$, and $X_{_li}$, as well as $X_{_i}$ and $S_{_i}$, using a disintegration coefficient (k_{dis}). Monod-type kinetics were used to describe substrate uptake in the intracellular biochemical reactions. In this study, two sequentially coupled simulators based on the ADM1 model were employed for the AR process and the BMP assay to provide a more comprehensive assessment of the inflowing sewage sludge, which will be explained in the following section.

In this study, we utilize a novel DAE-based (Differential Algebraic Equation) implementation of ADM1, developed in the Julia programming language. This implementation bears resemblance to a recent work by Allen et al. (2023). Our

implementation, however, adopts the DAE approach, instead of the ODE approach employed by [Allen et al. \(2023\)](#). Our choice of this approach was motivated by its exceptional computational efficiency, surpassing that of alternative DAE-based implementations in Java and Python. As a result, it empowers us to conduct intricate optimization analyses without incurring undue computational expenses.

The stoichiometric, biochemical and physicochemical model parameters values were those presented in [Rosén & Jeppsson \(2005\)](#), and were not modified to represent the situation under study.

Anaerobic reactor system simulation module

The first application of ADM1 was employed to simulate the treatment of influent sludge in the anaerobic reactor (AR), which is a continuous process. The SWS inflow is a complex particulate mixture, which is characterized by the COD mass (X_c). The primary constituents of X_c were found to be organic compounds (X_{ch} , X_{pr} , and X_{li}) and inorganic components (X_i and soluble inert material (S_i)). The unity (kg COD m^{-3}) was utilized to input X_c and other organic substrates into the model. Subsequently, X_c was decomposed into five distinct components, according to their corresponding proportions, as determined by the yield of the product to the substrate ($f_{product_substrate}$), which led to hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. The input state variables of the soluble fractions (S_s) in the AR ADM1 module were set based on a best fit procedure as explained below.

BMP system simulation module

The second application of ADM1 was employed to simulate the BMP, which is a batch assay. Inhibition was not applied, since the BMP tests had parameters such as temperature controlled, and pH maintained around the neutral value. The input parameters required for the BMP ADM1 module are the complete set of components that characterizes the AR outflow SW. The module predicts the curve of CH_4 production as a function of time as output.

Combined AR and BMP ADM1 model parameters selection and validation

A methodology employing two coupled stages—AR and BMP—was applied to model the entire AD process, including the original bioreactor, and to infer additional parameters from BMP assays. A block diagram of the combined ADM1 model is shown in [Fig. 2](#).

The first stage (AR ADM1 module) simulates a continuous-flow stirred-tank reactor (CSTR), while the second stage (BMP ADM1 module) simulates a batch reactor—the BMP assay. The output of the first module serves as the input for the second module. The input parameters of the first module are obtained through an iterative optimization solver. The solver minimizes the discrepancy between the simulated and measured values for the CH_4 production curve at selected times and the COD at the beginning of the BMP assay.

The methodology employed for determining the model parameters follows a least-squares optimization approach, elaborated as follows.

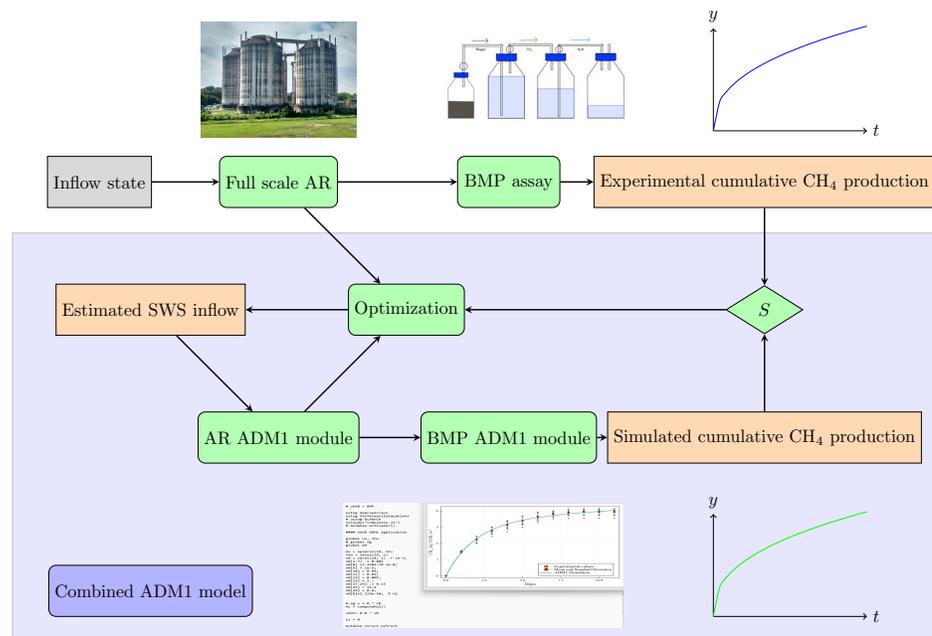


Figure 2 Schematic diagram of the methodological approach adopted in the present study: combined BMP assay—ADM1 model. Top: Experimental assay. The full scale AR receives SWS with Inflow state, and its outflow feeds the BMP assay that produces the experimental cumulative CH₄ production. Bottom: Combined ADM1 model, implemented in Julia language. An estimated SWS inflow enters the AR ADM1 module, and its output feeds the BMP ADM1 module, resulting in the Simulated cumulative CH₄ production. The sum of squared residuals *S* between the experimental and the simulated CH₄ production curves feeds the optimization routine that corrects the estimated SWS inflow parameters, until the sum of the squared residuals *S* is minimized.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.16720/fig-2

The primary objective of the least-squares optimization is to identify the model parameters that most effectively align with the experimental dataset. This dataset comprises ‘*n*’ data points represented as pairs (x_i, y_i) , $i = 1, \dots, n$, where x_i signifies an independent ADM1 parameter, and y_i corresponds to a dependent parameter derived from the BMP assays. The model function is denoted as $f(x_i, \Pi)$, with *m* adjustable parameters encompassed in the parameter vector Π . The ultimate aim is to determine the parameter values for the model that offer the closest fit to the data. The fitting quality of a model to a given data point is quantified by the residual r_i , which signifies the disparity between the observed value of the dependent variable and the value predicted by the model:

$$r_i = y_i - f(x_i, \Pi)$$

The parameters Π were determined through the weighted least-squares method to identify optimal values that minimize the sum of squared residuals, *S*, as in Poggio *et al.* (2016):

$$S = \sum_{i=1}^n \frac{r_i^2}{\sigma_{m,i}}$$

Here, $y_{m,i}$ represents the i th measured value of the target measurement, assumed to be a normally distributed random variable. $f(x_i, \Pi)$ denotes the model prediction at the time corresponding to data point i , treated as a function of the set of parameters Π to be estimated. Additionally, $\sigma_{m,i}$ stands for the standard error of the measurement, $y_{m,i}$, and serves as a weight for each term in the sum.

The standard error was estimated from the measured values, using the expression

$$\sigma_{m,i} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

where σ is the standard deviation, and n is the number of samples. In the case of the combined AR-BMP ADM1 model, the target measurement is the accumulated methane production along the BMP tests. The standard error of each measurement was estimated using the standard deviation of the BMP results.

Numerous optimization libraries are readily accessible within the Julia platform, facilitating rapid prototyping and experimentation with diverse strategies to address implementation optimization challenges. Various alternatives underwent testing, with Optimization.jl standing out. This library aims to amalgamate an array of optimization packages, both local and global, into a cohesive Julia interface. Optimization.jl introduces high-level attributes, such as seamless integration with automatic differentiation, rendering its utilization straightforward for most scenarios, all while retaining the entirety of options within a unified interface.

Though a simple gradient-based approach might suffice in certain instances, complications can arise due to positivity constraints. Gradient based methods suffer from many shortcomings such as slow convergence, difficulty with discontinuous problems, local minima and saddle points, among others. Consequently, an extensive array of methods available in the Optimization.jl library underwent evaluation in this work, ultimately revealing the DE/rand/1/bin method as the most suitable contender.

The “DE/rand/1/bin” optimization method is a specific variant of the Differential Evolution (DE) algorithm, a versatile technique for solving optimization challenges across domains.

The DE/rand/1/bin implemented in the Julia language Optimization.jl library was therefore used as the minimization technique, with a tolerance for convergence of $4E-3$ in the objective function. The estimation process is repeated using different initial guesses of parameters to check the convergence of the algorithm towards the same optimum values.

The combined AR-BMP model employs, as input data, the COD values of the wastewater treatment plant (WWTP) sludge and the CH_4 production from the BMP assay. The iterative optimization method is employed to find the initial condition of the WWTP sludge (X_{ch} , X_{pr} , and X_{li}), as well as the effective hydraulic retention time (HRT) of the AR, which are input parameters of the AR ADM1 model. The search method is iterated until the initial conditions of the BMP ADM1 module, obtained from the AR module, result in a simulated CH_4 production curve that best matches the values at the points of the methanogenic curve obtained in the BMP assay.

As a result, the coupled AR-BMP model produces a simulated BMP methanogenic curve that best fits the values of the methanogenic curve obtained in the BMP experimental assays, in the least squares sense. The model was thus calibrated using the experimental

Table 2 Sewage sludge physicochemical parameters.

| Parameters | Unity | Anaerobic sewage |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| pH _i –pH _f | – | 7.43–7.60 |
| TS | % | 2.0 |
| TVS | % | 1.1 |
| VSS | % | 0.8 |
| COD _t | mg L ⁻¹ | 21,903 ± 1000 |
| Alkalinity | mg CaCO ₃ L ⁻¹ | 2,382 ± 100 |
| TOC | mg L ⁻¹ | 895 ± 100 |

Notes.

pH_i, pH initial; pH_f, Final pH average; %TS, Total solids percentage; %TVS, Total volatile solids percentage; %VSS, Volatile suspended solids percentage; TCOD_i, Total initial Chemical Oxygen Demand; TOC, Total Organic Carbon.

data to accurately simulate the AD process. The output of the first model results in sludge with COD values similar to the WWTP biodigester sludge. Additionally, it produces a more complete description of the AR outflow SW which is consistent with the input data.

RESULTS

Substrate characterization

Table 2 shows the SWS physicochemical characterization used as feedstock in the BMP assays. Discrete changes in pH (7.43 ± 0.1 to 7.60 ± 0.1) were observed after 11 days in the reactor (Table 2), which is within the expected range, due to the growth of microorganisms (MO) and biogas production in all reactors without the addition of a buffer solution. The substrate pH was recorded at the beginning and end of the experiment to ensure that inhibition did not occur in the microbial communities. Alkalinity ($2,382 \pm 100$ mg CaCO₃ L⁻¹) and COD_t value ($21,903 \pm 1,000$ mg L⁻¹) (Table 2) indicate the sludge's capability of buffering the reaction and the oxygen consumption capacity during the oxidation of the sludge organic matter (OM) into CO₂ and water. TOC (895 ± 100 mg CaCO₃ L⁻¹) is the carbon in the OM oxidized and measured through the release as CO₂. The biological processes lie in the ability of MO to use biodegradable organic compounds and transform them into by-products (Lucas *et al.*, 2015). Regarding solid series, the following results were obtained after SWS characterization (Table 2): total solids (TS) 2.0%, total volatile solids (TVS) 1.1%, and volatile suspended solids (VSS) 0.8%. This suggests that anaerobic sludge contains more organic than inorganic compounds. The amount of biomethane yield produced is related to the mass of VS in these samples.

BMP assay results

The curves of cumulative CH₄ production (Fig. 3) are within a narrow range of values and the standard deviation curve (Fig. 4) shows that the BMP reactors achieved good reproducibility. The round of experiments (R1 to R6) produced the following CH₄ values (Table 3): 124, 143, 137, 142, 140, and 130 NmL CH₄. These results indicate that the BMP assays were accurate and effective. During BMP assays, biogas production curves can follow diverse patterns (Batstone *et al.*, 2015), and these patterns have meaningful implications (Labatut, Angenent & Scott, 2011). Temperature plays a crucial

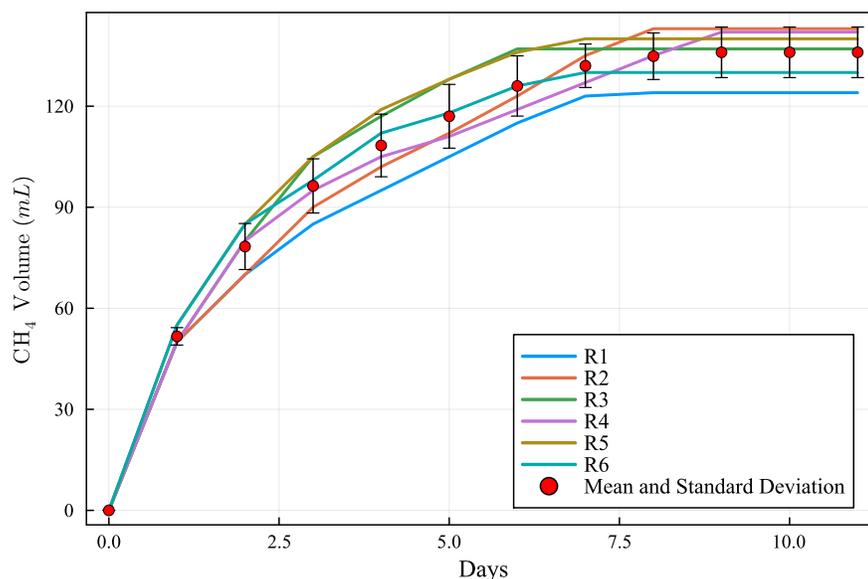


Figure 3 Methane cumulative production during the experiment: R1 to R6 (124, 143, 137, 142, 140 and 130 NmL CH₄, respectively), mean and standard deviation.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.16720/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.16720/fig-3)

role in microbial interactions and affects the stability and performance of AD and the thermodynamic equilibrium of biochemical reactions in the AD process (Lin *et al.*, 2017).

The proposed BMP assay setup enabled daily measurement of biogas volume, which yielded satisfactory results. The alkaline solution used in the setup efficiently retained the produced CO₂. Furthermore, the BMP assays were conducted at mesophilic temperature, which contributed to the stability of the system. Mesophilic reactors are preferred for easy biodegradable biomass (Issah, Kabera & Kemausuor, 2020). The CH₄ yield production was found to be 113, 130, 124, 129, 127, and 118 mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹ in R1 to R6, respectively. These results demonstrate the effectiveness and accuracy of the experimental rounds conducted for the BMP assays (Table 4 and Fig. 5).

Table 5 shows the final (tCOD_f) values and the biodegradability rate (23–28%). The CH₄ yield can be normalized either per volume of substrate (mL CH₄ L⁻¹), substrate mass volatile solids (mL CH₄ g⁻¹ VS), or substrate mass chemical oxygen demand (COD) (mL CH₄ g⁻¹ COD_{sub}). The last method allows direct conversion of the results into percentage of OM converted to methane using the theoretical calculation of 0.350 m³ CH₄ per kg COD converted (McCarty, 1964).

Combined ADM1 computational simulation

The simulation results, employing the above data and model parameters presented in Table 6, are shown in Fig. 5, along with the results from the BMP assay. The simulated production curve is very similar to the one obtained in the BMP assay, indicating that the combined ADM1 model can reproduce the expected results. This makes the computational simulation (CS) a useful tool for elaborating and planning laboratory experiments. Tables 7

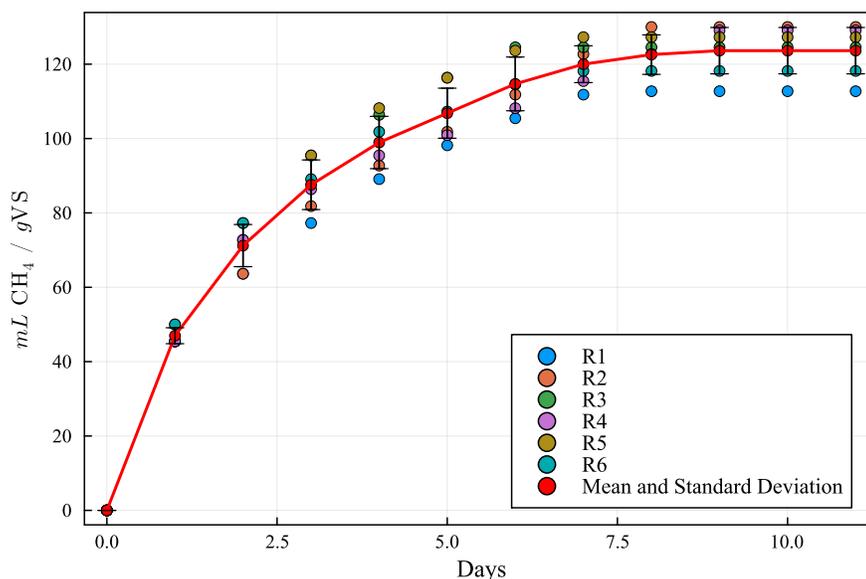


Figure 4 Methane production yields R1 to R6 (113, 130, 124, 129, 127 and 118 mL CH₄/g VS, respectively), mean and standard deviation.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.16720/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.16720/fig-4)

Table 3 Methane production from sewage sludge in BMP assays ($n = 6$).

| Experiment | Unit | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | Mean ± s.d. |
|-----------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|
| CH ₄ | mL | 124 | 143 | 137 | 142 | 140 | 130 | 136 ± 7.5 |
| CH ₄ yield | mL CH ₄ g ⁻¹ VS | 113 | 130 | 124 | 129 | 127 | 118 | 124 ± 6.23 |
| CH ₄ yield | mL CH ₄ g ⁻¹ COD | 5.6 | 6.5 | 6.2 | 6.1 | 5.9 | 6.3 | 6.15 ± 0.9 |

and 8 show the SWS composition according to the ADM1 model, applying the iterative optimization method and based on the SWS COD initial real value in the BMP assay feedstock.

The data in Table 7 show that the AR inflow is well characterized basically by a mixture of complex composites (40.769 kg COD m⁻³), with a small addition of protein (8.127 kg COD m⁻³), and trace amounts of additional lipids (8.127 kg COD m⁻³) and inert particulate (0.087 kg COD m⁻³).

It must be stressed that the complex composites category in ADM1 results in a predefined distribution of carbohydrates, proteins, lipids, and inert particulate matter when hydrolyzed. Thus, the net effect of including additional protein, lipids and inert particulate is to correct the default composition of the complex composite and to produce simulation results that better approximate the observed data.

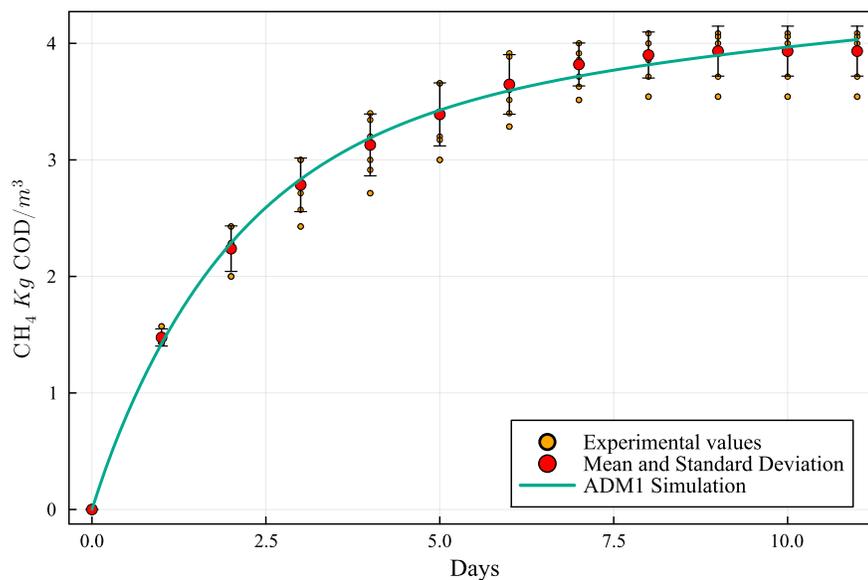
The results obtained by the ADM1 modeling were very close to those obtained experimentally in the BMP test, illustrating the quality of the model proposed by the International Water Association (IWA). By using this model together with a least-squares

Table 4 Methane production from sewage sludge in experimental assays in the literature.

| Reactor type | OS | Temp (°C) | HRT (days) | Y _m (mL CH ₄ g ⁻¹ VS) | Reference |
|--------------|----|-----------|------------|--|---|
| Batch BMP | PS | 37 | 20 | 138.2 | <i>Alves et al. (2020)</i> |
| Batch | SS | 35 | n.a. | 182 | <i>Bai & Chen (2020)</i> |
| Batch BMP | SS | 37 | n.a. | 124.4 | <i>Pan et al. (2019)</i> |
| Batch BMP | SS | 35 | n.a. | 182 | <i>Ripoll et al. (2020)</i> |
| BMP | PS | 35 | 13 | 159 | <i>Xie, Wickham & Nghiem (2017)</i> |
| BMP | SS | m | 35 | 121 | <i>Kashi et al. (2017)</i> |
| Batch | SS | 35 | 40 | 88.1 | <i>Zou et al. (2018)</i> |
| Batch | SS | 35 | 10 | 135.6 | <i>Xie et al. (2020)</i> |
| Batch | SS | 37 | 35 | 142.7 | <i>Zhang et al. (2014)</i> |
| Batch | SS | 37 | 11 | 124 | This study |

Notes.

OS, organic substrate; SS, sewage sludge; PS, primary sludge; m, mesophilic; Y_m, CH₄ yield; n.a., not available.

**Figure 5** Methanogenic curve obtained with the BMP experimental assay versus the curve obtained with the computational simulation using the ADM1 simulation model.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.16720/fig-5](https://doi.org/10.7717/peerj.16720/fig-5)

iterative method, a detailed SWS composition consistent with the BMP data was found (Table 8).

Table 8 shows the main concentrations present in the AR sludge, which include inert particulate, complex composite, inert soluble, and amino acid consumers. The composition of the AR sludge indicates a significant decrease in the concentration of complex composite (to approximately 5 kg COD m⁻³) and a considerable increase in the concentrations of inert particulate and inert soluble. Results in Table 8 were obtained by numerical calculation,

Table 5 Biodegradability data in BMP assays ($n = 6$).

| Replicates | pH _{final} | TCOD _f (mg L ⁻¹) | COD removal (%) |
|------------|---------------------|--|--------------------|
| R1 | 7.5 | 16,820 | 23.2 |
| R2 | 7.65 | 15,680 | 28.4 |
| R3 | 7.61 | 16,714 | 23.7 |
| R4 | 7.6 | 16,316 | 25.5 |
| R5 | 7.58 | 16,512 | 24.7 |
| R6 | 7.75 | 16,970 | 23.5 |

and refer to the modeled composition output of the AD, and feed to the BMP model that best approximates the results of experimental BMP results.

The low concentration of the composite X_c when compared to the inert X_i and S_i concentrations is consistent with a composition of the output variable values of a AD, where the X_c undergoes an efficient consumption.

Also the high values of X_{aa} and X_{ac} , when compared to other five biomass fractions, are compatible with results found in other AD simulations and experimental results.

Total acetate concentration is fed by six processes (with biochemical process rates ρ_5 to ρ_{10}) thus resulting in an acetate concentration that is comparatively higher than each of the six original sources. Also, acetate consumers do not have a faster metabolism compared to other consumers in the process. For instance, $K_{m_{ac}} = 8 \text{ d}^{-1}$, while $K_{m_{pro}} = 6 \text{ d}^{-1}$. Combining these two factors (larger concentration of acetate and relatively slow acetate consumers biochemical process rates), a larger mass of acetate consumers X_{ac} is required to consume the results of the acetogenic metabolic pathway production. If not properly taken into account, the high concentration of acetate could lead to reduced methane production due to the inhibition of acetoclastic methanogens caused by low pH.

On the other hand, protein load in the feed is relatively high, and amino acid production is proportionally high, thus a larger mass of amino acid consumers X_{aa} is to be found at the AD process output when the process reaches a steady state. A relatively high concentration of proteins, relative to carbohydrates and lipids is not uncommon in wastewaters in tropical climates.

By matching the ADM1 results with the BMP assays experimental measurements, an equivalent composition was obtained (Table 8 and Fig. 5). Table 9 provides a numerical comparison between BMP CH_4 production experimental results and ADM1 computational results, showing a maximum discrepancy of less than 2.8%. Based on the similarity of the results, it can be concluded that the model is suitable to characterize SWS and biogas production potential.

Results of validation of ADM1 model DAE-Based Julia implementation

The new Julia language implementation of the DAE-ADM1 model is validated comparing results with the ODE-Based Julia implementation (Allen et al., 2023). Validation tests were performed on various benchmark problems, showing very good agreement. In this section

Table 6 ADM1 stoichiometric, biochemical and physiochemical model parameters values used in the simulations. Values not marked are taken from Rosen and Jeppson (2006). Values highlighted with “*” are modified, and the original values are shown between parentheses “()”.

| Parameter | Value | Unit | Parameter | Value | Unit | Parameter | Value | Unit |
|-----------|-------------|----------------|------------|-----------------------|-----------------------|-------------|-----------------|-----------------------|
| R | 0.083145 | bar / M K | f_ac_aa | 0.4 | – | pH_UL_h2 | 6 | – |
| T_base | 298.15 | K | C_va | 0.024 | kmole C/Kg COD | pH_LL_h2 | 5 | |
| P_atm | 1.013 | bar | Y_aa | 0.08 | | k_dec_X_su | 0.02 | |
| T_op | 308.15 | K | Y_fa | 0.06 | | k_dec_X_aa | 0.02 | |
| f_sl_xc | 0.1 | | Y_c4 | 0.06 | – | k_dec_X_fa | 0.02 | |
| f_xl_xc | 0.2 | | Y_pro | 0.04 | | k_dec_X_c4 | 0.02 | 1/d |
| f_ch_xc | 0.2 | – | C_ch4 | 0.0156 | kmole C/Kg COD | k_dec_X_pro | 0.02 | |
| f_pr_xc | 0.2 | | Y_ac | 0.05 | – | k_dec_X_ac | 0.02 | |
| f_li_xc | 0.3 | | Y_h2 | 0.06 | – | k_dec_X_h2 | 0.02 | |
| N_xc | 0.002685714 | | k_dis | 0.5 | | T_ad | 308.15 | K |
| N_I | 0.004286 | kmole N/Kg COD | k_hyd_ch | 10 | | K_h2o | 2.08E–14 | |
| N_aa | 0.007 | | k_hyd_pr | 10 | 1/d | K_a_va | 1.38E–05 | |
| C_xc | 0.02786 | | k_hyd_li | 10 | | K_a_bu | 1.51E–05 | |
| C_sl | 0.03 | | K_S_IN | 0.0001 | M | K_a_pro | 1.32E–05 | M |
| C_ch | 0.0313 | | k_m_su | 30 | 1/d | K_a_ac | 1.74E–05 | |
| C_pr | 0.03 | | K_S_su | 0.5 | Kg COD/m ³ | K_a_co2 | 4.94E–07 | |
| C_li | 0.022 | kmole C/Kg COD | pH_UL_aa | 5.5 | – | K_a_IN | 1.11E–09 | |
| C_xl | 0.03 | | pH_LL_aa | 4 | | k_AB_va | 1.00E+10 | |
| C_su | 0.0313 | | k_m_aa | 50 | 1/d | k_AB_bu | 1.00E+10 | |
| C_aa | 0.03 | | K_S_aa | 0.3 | Kg COD/m ³ | k_AB_pro | 1.00E+10 | |
| f_fa_li | 0.95 | – | k_m_fa | 6 | 1/d | k_AB_ac | 1.00E+10 | 1/M d |
| C_fa | 0.0217 | kmole C/Kg COD | K_S_fa | 0.4 | Kg COD/m ³ | k_AB_co2 | 1.00E+10 | |
| f_h2_su | 0.19 | | K_I_h2_fa | * 5.00E–04 (5.00E–06) | | k_AB_IN | 1.00E+10 | |
| f_bu_su | 0.13 | | k_m_c4 | 20 | 1/d | p_gas_h2o | 0.055667745 | bar |
| f_pro_su | 0.27 | – | K_S_c4 | 0.2 | Kg COD/m ³ | k_p | 50000 | m ³ /d bar |
| f_ac_su | 0.41 | | K_I_h2_c4 | 1.00E–05 | | k_L_a | 200 | 1/d |
| N_bac | 0.005714286 | kmole N/Kg COD | k_m_pro | 13 | 1/d | K_H_co2 | 0.027146693 | |
| C_bu | 0.025 | | K_S_pro | 0.1 | Kg COD/m ³ | K_H_ch4 | 0.001161903 | M/bar |
| C_pro | 0.0268 | | K_I_h2_pro | 3.50E–06 | | K_H_h2 | 0.000738465 | |
| C_ac | 0.0313 | kmole C/Kg COD | k_m_ac | 8 | 1/d | V_liq | * 3485.4 (3400) | m ³ |
| C_bac | 0.0313 | | K_S_ac | 0.15 | Kg COD/m ³ | V_gas | 300 | |
| Y_su | 0.1 | | K_I_nh3 | 0.0018 | M | Q_ad | * e246.67 (170) | m ³ /d |
| f_h2_aa | 0.06 | | pH_UL_ac | 7 | – | tresX | 40 | d |
| f_va_aa | 0.23 | – | pH_LL_ac | * 5.9 (6) | | k_dec_all | 0.02 | 1/d |
| f_bu_aa | 0.26 | | k_m_h2 | 35 | 1/d | | | |
| f_pro_aa | 0.05 | | K_S_h2 | 7.00E–06 | Kg COD/m ³ | | | |

we present the results of the test performed on the data obtained in the previous section (Tables 6 and 7), in order to provide a validation of the results of the simulations performed in this work.

Figures 6 to 10 show the results of the AR simulation using the current DAE implementation, compared to the results obtained by the DAE implementation of Allen *et al.* (2023). The validation tests demonstrate that the results have a very good agreement,

Table 7 ADM1 model input of the biodigester. The values for complex composites, proteins, lipids, inert particulate, highlighted with “*”, are determined by the optimization routine.

| Variables | Value | Unit |
|-----------|----------|------------------------|
| S_su | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| S_aa | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_fa | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_va | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_bu | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_pro | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_ac | 0.001 | Kg COD/ m ³ |
| S_h2 | 1.0E−8 | Kg COD/ m ³ |
| S_ch4 | 1.0E−5 | Kg COD/ m ³ |
| S_IC | 0.04 | kmole C/m ³ |
| S_IN | 0.01 | kmole N/m ³ |
| S_I | 0.02 | Kg COD/ m ³ |
| X_xc | * 40.769 | Kg COD/ m ³ |
| X_ch | 0.00 | Kg COD/ m ³ |
| X_pr | * 8.127 | Kg COD/ m ³ |
| X_li | *0.252 | Kg COD/ m ³ |
| X_su | 0.00 | Kg COD/ m ³ |
| X_aa | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_fa | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_c4 | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_pro | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_ac | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_h2 | 0.01 | Kg COD/ m ³ |
| X_I | * 0.087 | Kg COD/ m ³ |
| S_cat | 0.04 | kmole/m |
| S_an | 0.10 | kmole/m |

both for the steady state results and for the transient regime results, thus providing a quantitative validation of the new implementation.

The time-dependent curves (Figs. 6 to 10) show that, while some concentrations attain the steady state value very shortly after the startup (about 10 days, as it is the case of X_c), most concentrations only attain their steady state after a much longer period (typically 60 days, as in the case of X_su). However, it can be observed that the concentrations do not vary after 80 days, thus the current 90 day simulation period is sufficient for the AR to reach steady state conditions.

The computational time of the current DAE-based Julia implementation compares favorably with the ODE-Based Julia implementation by a large factor. The mean execution time for the AR simulation with the current DAE-based implementation is 22.15 ms, while with the ODE-based implementation (Allen et al., 2023), the mean execution time is 1,231 ms. Therefore, the current ODE-based implementation is approximately 56 times faster than the DAE-based implementation. Thus, the new implementation is more suitable to

Table 8 ADM1 model AR output variables and BMP initial composition.

| Sludge composition and model variables (Kg COD/m ³) | | | |
|---|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| x0 ₁ =1.5031e−02 | S_su, Monosaccharide | x0 ₁₃ =5.0183e+00 | X_c, Complex Composite |
| x0 ₂ =6.7129e−03 | S_aa, Amino Acid | x0 ₁₄ =4.9515e−02 | X_ch, Carbohydrate |
| x0 ₃ = 1.2853e−01 | S_fa, LCFA | x0 ₁₅ =1.5778e−01 | X_pr, Proteins |
| x0 ₄ = 1.4532e−02 | S_va, Total Valerate | x0 ₁₆ =7.7605e−02 | X_li, Lipids |
| x0 ₅ =1.6795e−02 | S_bu, Total Butyrate | x0 ₁₇ =6.0868e−01 | X_su, Sugar Consumers |
| x0 ₆ =2.0244e−02 | S_pro, Total Propionate | x0 ₁₈ =1.4414e+00 | X_aa, Amino Acid Consumers |
| x0 ₇ =4.2027e−02 | S_ac, Total Acetate | x0 ₁₉ =4.9932e−01 | X_fa, LCFA Consumers |
| x0 ₈ =0.00 | S_h2, Hydrogen Gas | x0 ₂₀ =5.2954e−01 | X_c4, Valerate/Butyrate Consum. |
| x0 ₉ =0.00 | S_ch4, Methane Gas | x0 ₂₁ =1.6868e−01 | X_pro, Propionate Consumers |
| x0 ₁₀ =6.3799e−01 | S_IC, Inorganic Carbon | x0 ₂₂ =1.0750e+00 | X_ac, Consumers of Acetate |
| x0 ₁₁ =1.2453e−01 | S_IN, Inorganic Nitrogen | x0 ₂₃ =4.5639e−01 | X_h2, Hydrogen Consumers |
| x0 ₁₂ =3.7066e+00 | S_I, Inert Soluble | x0 ₂₄ = 7.5005e+00 | X_I, Inert Particulate |

Table 9 Comparison between BMP CH₄ production experimental results and ADM1 computational results (mL CH₄ g^{−1} VS^{−1}).

| Day | CH ₄ BMP | CH ₄ ADM1 | Error (%) |
|-----|---------------------|----------------------|-----------|
| 0 | 0 | 0.0000 | 0 |
| 1 | 46.9697 | 46.4013 | −1.2101 |
| 2 | 71.2121 | 72.8888 | 2.3545 |
| 3 | 87.5758 | 89.5668 | 2.2735 |
| 4 | 98.4848 | 100.3918 | 1.9363 |
| 5 | 106.3636 | 107.6856 | 1.2429 |
| 6 | 114.5455 | 112.8359 | −1.4925 |
| 7 | 120.0000 | 116.6777 | −2.7685 |
| 8 | 122.5758 | 119.7153 | −2.3336 |
| 9 | 123.6364 | 122.2534 | −1.1186 |
| 10 | 123.6364 | 124.4768 | 0.6797 |
| 11 | 123.6364 | 126.4973 | 2.3140 |

perform model parameter estimations and operational parameters optimization. The tests were performed on an Intel(R) Core(TM) i7-1060NG7 CPU @ 1.20 GHz, with 16GB 3733 MHz LPDDR4X memory, macOS Ventura 13.5.2, and Julia v1.9.

DISCUSSION

Operational parameters and biogas production

AD pH stability is the main controlling factor in balancing the system (*Issah, Kabera & Kemausuor, 2020*). No pH adjustments were made during the BMP assays due to the buffer capacity of the SWS. The twice-daily stirring and agitation of the digesting vessels allow for the release of gas during the assays and at the same time avoiding clogging of the connecting valves. Biogas yield decreases when the pH value is higher than 7.6 or lower than 6.8 (*Pilarski et al., 2020*). Process variables, such as temperature and pH, are the principal

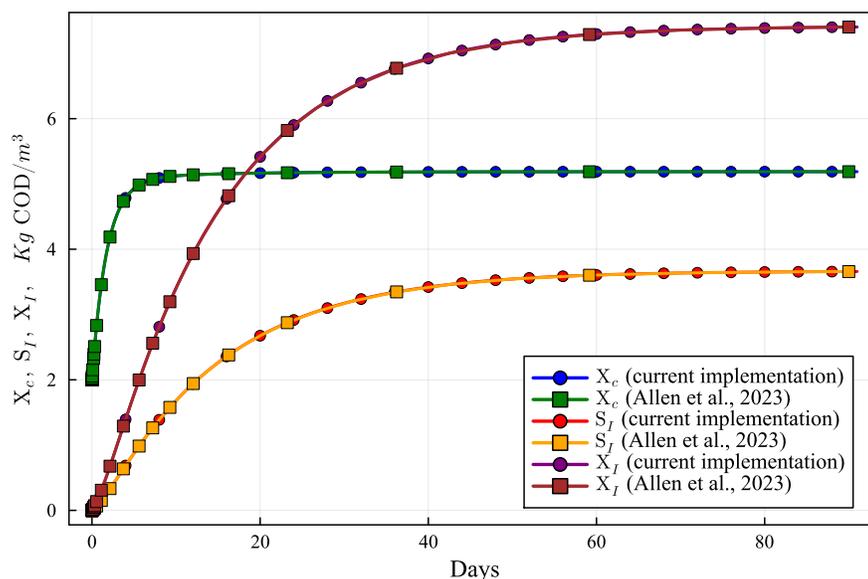


Figure 6 Concentration curves of X_c , S_I and X_I obtained with the computational simulation of the AR using the current DAE-ADM1 model implementation, compared with the results obtained with ODE-ADM1 model (Allen et al., 2023). Lines with circles correspond to values obtained in the current simulations. Curves with squares are obtained with the ODE-ADM1 model, showing virtually identical results.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.16720/fig-6

factors affecting the smooth digestion process (Castellano-Hinojosa et al., 2018). At very high or very low temperatures, bacterial and archaeal activities may be curtailed, leading to low yields, and unbalanced pH could result in volatile fatty acid (VFA) accumulation that could result in MO mortality (Issah, Kabera & Kemausor, 2020), especially methanogenic ones.

High values for alkalinity indicate that the reaction is buffered, so the pH does not undergo major changes (Angelidaki et al., 2013). The SWS alkalinity value in this study ($2,382 \pm 100 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) is similar to the alkalinity found in other SWS from WWTP as observed by Grosser et al. (2020), who investigated the BMP of SWS from a WWTP in Poland ($2,823 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$).

The tCOD value ($21,903 \pm 1,000 \text{ mg L}^{-1}$) is consistent with values found in other studies, such as $25,250 \text{ mg L}^{-1}$ by Park et al. (2021) and $22,300 \text{ mg L}^{-1}$ by Wickham et al. (2018).

As MO converts chemical energy to CH_4 , this is directly associated with the maximum energy that can be recovered as biogas (Raposo et al., 2012). The inoculum taken from an active anaerobic digester (AR) that is digesting complex organic matter (OM) and is at a steady state at the time of sampling provides a highly diverse microbial community, able to digest a large variety of organic molecules (Holliger et al., 2016).

Similar results for SWS mono-digestion (Table 4) were also reported by Alves et al. (2020) ($138.2 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ VS}^{-1}$), Pan et al. (2019) ($124.43 \text{ mL g}^{-1} \text{ VS}^{-1}$), Park et al. (2021) ($100\text{--}175 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ VS}^{-1}$), and Zou et al. (2018) ($88.1 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ VS}^{-1}$).

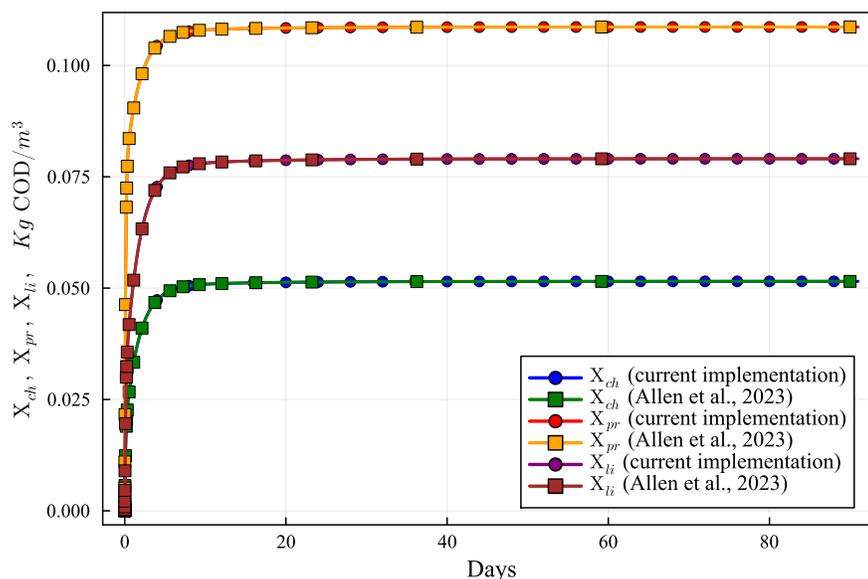


Figure 7 Concentration curves of X_{ch} , X_{pr} and X_{li} obtained with the computational simulation of the AR using the current DAE-ADM1 model implementation, compared with the results obtained with ODE-ADM1 model (Allen et al., 2023). Lines with circles correspond to values obtained in the current simulations. Curves with squares are obtained with the ODE-ADM1 model, showing virtually identical results.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.16720/fig-7

The sanitation sector, with the use of SWS AD, has the possibility of transforming an environmental liability into an energy asset.

Carbon content and sludge biodegradability

The biodegradability rate achieved in the present study is consistent with the COD removal percentages reported in previous studies based on SWS BMP assays, such as Maragkaki et al. (2018), Kashi et al. (2017), and Zhang, Hu & Lee (2016), which achieved removal percentages of 28.9%, 16.0%, and 25.2%, respectively. OM is measured by the amount of carbon in a feedstock (Ferguson, Coulon & Villa, 2018; Gohil et al., 2018) and biomethane yield is affected by the VS content (Mayer et al., 2014). Therefore, CH_4 production is directly related to the degradation of VS (Angelidaki et al., 2009) being VS the OM component of TS.

Systems used in AD are classified according to the percentage of TS in the feedstock (Yi et al., 2014). The biogas yield mainly depends on the content of organic compounds in the feedstock, including fats, proteins, and carbohydrates, which are biologically degradable under AD (Abdul Aziz, Hanafiah & Mohamed Ali, 2019). Anaerobic MO can be inhibited by substances present in the substrate or by compounds generated in the metabolism itself (Mustapha et al., 2018). The biochemical methane production potential of the substrates intended for anaerobic digestion and their specific organic loads can be utilized to design various components of full-scale AD plants, including the size of digesters and the potential for utilizing the generated biogas (Filer, Ding & Chang, 2019).

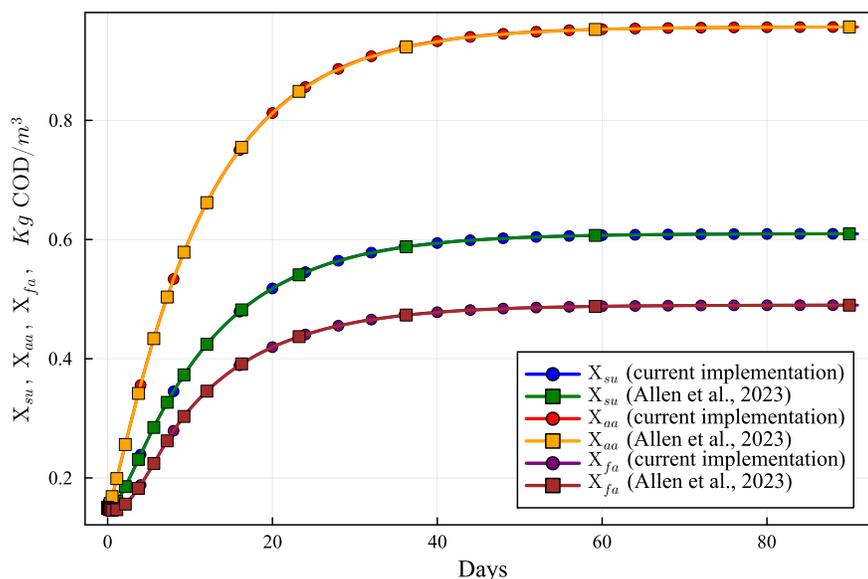


Figure 8 Concentration curves of X_{su} , X_{aa} and X_{fa} obtained with the computational simulation of the AR using the current DAE-ADM1 model implementation, compared with the results obtained with ODE-ADM1 model (Allen et al., 2023). Lines with circles correspond to values obtained in the current simulations. Curves with squares are obtained with the ODE-ADM1 model, showing virtually identical results.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.16720/fig-8

SWS is an optimal inoculum for BMP assays because of the diversity of its microbial population (Raposo et al., 2011). A well-functioning AD must contain a balanced microbial consortium community for efficient biogas production (Issah, Kabera & Kemausuor, 2020). The experimental results showed that the SWS obtained from a municipal WWTP has the capability to produce CH_4 , and it is considered as a feasible strategy for bioenergy production. The biodegradability properties of substrates and production of inhibitory intermediate products will mainly control the kinetics of AD different steps and define the shape of the biogas production curve, identifying important characteristics of substrates and anticipating digestion issues (Labatut, Angenent & Scott, 2011).

COD is commonly used to measure the organic strength of liquid effluents. At WWTPs, each kilogram of COD removed will yield 0.35 m^3 of CH_4 gas at standard temperature and pressure (Jingura & Kamusoko, 2017). The theoretical CH_4 yield can be calculated from the COD of a substrate, and biogas production in relation to COD is about 0.5 L g^{-1} COD removed, corresponding to a CH_4 production of approximately 0.35 L g^{-1} of COD removed (Angelidaki & Sanders, 2004).

Feasibility of using the model as a tool to predict BMP results

The ADM1 CS can be used to compare the decrease in COD observed experimentally with the values obtained from numerical simulation. Furthermore, the model can be validated by comparing and calibrating the methanogenic activity and production curves. AD processes are conducted under laboratory conditions and scaled to pilot-scale trials.

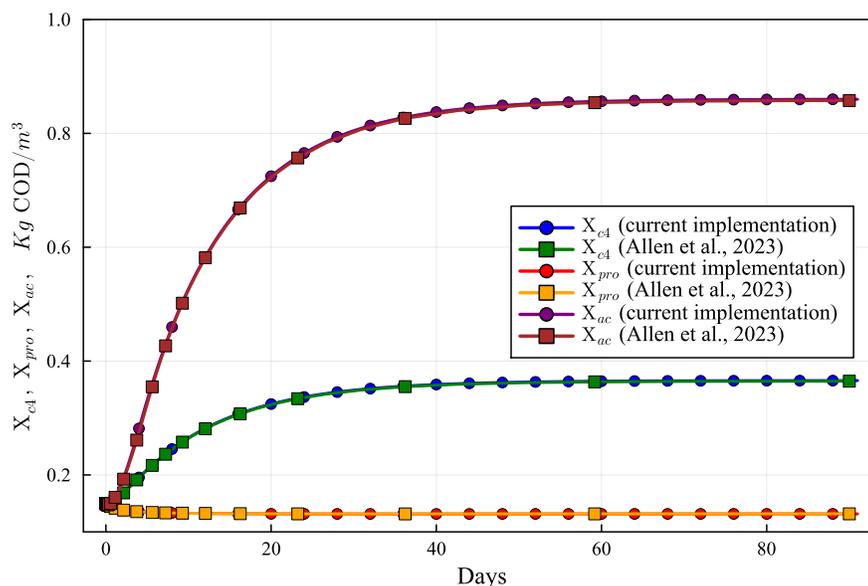


Figure 9 Concentration curves of X_{c4} , X_{pro} and X_{ac} obtained with the computational simulation of the AR using the current DAE-ADM1 model implementation, compared with the results obtained with ODE-ADM1 model (Allen et al., 2023). Lines with circles correspond to values obtained in the current simulations. Curves with squares are obtained with the ODE-ADM1 model, showing virtually identical results.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.16720/fig-9

This methodology can be applied to support the development of experiments and full-scale reactor projects. The generated BMP data's scalability and transferability allow the results to be applied to larger-scale systems, facilitating the development and optimization of AD processes (Jingura & Kamusoko, 2017).

The ADM1 model can be adapted to individual cases. There are certain factors in ADM1 that require the user's discretion, such as the fractionation of composition (X_c) and the definition of inert ingredients, soluble (SI) and particulate (XI). However, there are hypotheses that may restrict the model's applicability in anoxic environments. For instance, the influent particulate composite substrate and the cytolysis product use the same component X_c , which requires a disintegration process before hydrolysis. Therefore, characterizing the influent sludge becomes particularly challenging.

Combined AR-BMP model output and comparison with BMP assay: estimation of outflow composition, biogas production, and operation parameters of the full-scale AR

The methodology developed in this study involved using two coupled ADM1 models to validate the complete AD process, including the original bioreactor, and to infer additional parameters from the BMP assays. The first model simulates a continuous-flow stirred-tank reactor (CSTR), and the second model simulates the BMP assay, which is a batch reactor. The input of the second model is given by the output of the first model, and the input parameters of the first model are obtained by means of an iterative optimization method

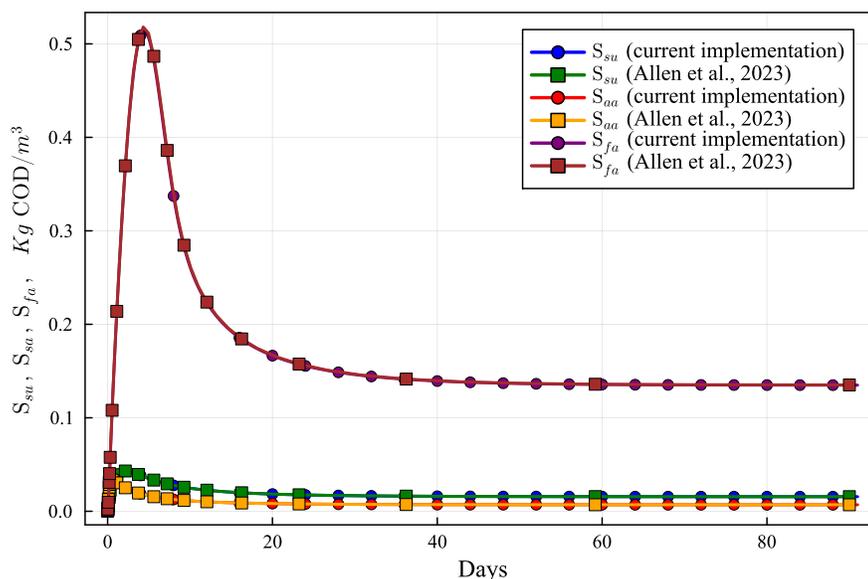


Figure 10 Concentration curves of S_{su} , S_{aa} and S_{fa} obtained with the computational simulation of the AR using the current DAE-ADM1 model implementation, compared with the results obtained with ODE-ADM1 model (Allen et al., 2023). Lines with circles correspond to values obtained in the current simulations. Curves with squares are obtained with the ODE-ADM1 model, showing virtually identical results.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.16720/fig-10

that minimizes the error of the obtained methane production curve along with the COD at the beginning of the BMP assay, as seen in Fig. 2. Therefore, the proposed methodology, using the combined ADM1 model, solves the challenging problem of characterizing the influent sludge in a systematic way.

This methodology can be applied to support the development of experiments and full-scale reactor projects. The scalability and transferability of the data obtained with BMP assays can be used to apply the results in larger-scale systems (Jingura & Kamusoko, 2017).

The feasibility of using the model as a tool to predict BMP assays results and reduce possible mistrust in experimental results can be further evaluated by comparing the COD decrease observed experimentally in bench-scale and the values obtained in the numerical simulation. Also, the methanogenic activity and the production curve can be compared and calibrated to validate the model.

Optimization of operational parameters using the combined AR-BMP model calibrated with BMP assays

Once the AR-BMP simulator is calibrated, it can be employed to optimize operational parameters of the AR system. As the new Julia language implementation of the BSM2 DAE ADM1 model developed in this work is very fast, when compared to previous implementations, it is very well suited for optimization purposes.

To demonstrate the capabilities of the methodology, an example of the optimization of the AR operational parameters is presented. In this example, the influence of the parameters

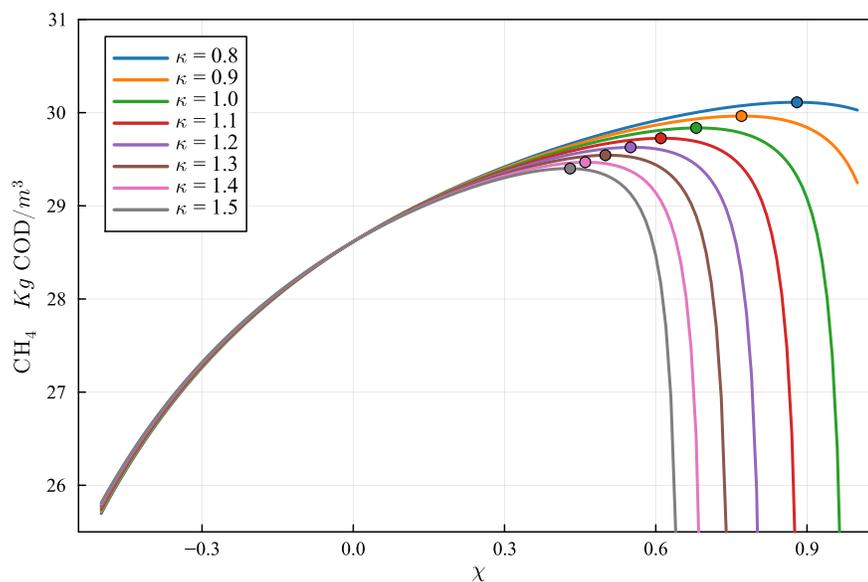


Figure 11 Optimization of the production curve of CH_4 , considering a simple mixing/stratification model. The optimum production for the case $\kappa = 1.0$ is obtained for $\chi = 0.68$, and the optimum production value is 29.84 kg COD/m^3 of effluent. The optimum values, for different values of κ , is marked by a dot in each curve. The relevant data is shown in Table 9.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.16720/fig-11

solute residence time, and particulate residence time is analyzed. The residence time can be increased by improving the flow patterns on the AR with inappropriate mixing, reducing slow recirculation flow regions or dead zones and dead time. On the other hand, particulate residence time can be selectively increased by providing a low mixing region at the outflow region, allowing for particle segregation due to the settling velocity.

To perform an optimization study, we define the following parameters:

$$\chi = \frac{V_p}{V} - 1$$

$$\kappa = \frac{V - V_s}{V_p - V}$$

where V , V_p , V_s are the reactor nominal effective volume, the particulate effective volume, and the solute effective volume. Results of the simulations using the calibrated model for various values of χ and κ are shown in Fig. 11. It can be observed that the CH_4 production improves, for all values of κ , with the increase of χ from 0 up to an optimal value. The optimization provides the best value of χ for each value of the parameter κ , keeping the same reactor nominal effective volume V . Table 10 shows the CH_4 production at the optimum χ for each of the simulated κ values. It can be observed that CH_4 production can be increased by more than 5%, with respect to the unmodified parameter values, by optimizing the values of χ and κ .

Table 10 Optimization of residence time parameters κ and χ to improve CH₄ production.

| κ | Optimal χ | CH ₄ production | Production increment (%) |
|----------|----------------|----------------------------|--------------------------|
| 0.8 | 0.88 | 30.11 | 5.23 |
| 0.9 | 0.77 | 29.96 | 4.71 |
| 1.0 | 0.68 | 29.83 | 4.26 |
| 1.1 | 0.61 | 29.73 | 3.88 |
| 1.2 | 0.55 | 29.63 | 3.54 |
| 1.3 | 0.50 | 29.54 | 3.24 |
| 1.4 | 0.46 | 29.47 | 2.98 |
| 1.5 | 0.43 | 29.4 | 2.74 |

This methodology can be employed, along with numerical simulations of the particulate fluid flow or the results of properly reduced scale models, to assess the potential benefits of a proposed improvement of the process.

CONCLUSIONS

The present study was based on the assembly of bench-scale bioreactors (BMP assays) and the use of experimental data obtained to feed the ADM1 mathematical model with subsequent calibration to simulate the anaerobic digestion of an anaerobic sludge obtained at a municipal WWTP. The bench scale BMP assays resulted in cumulative CH₄ production ranging from 124 to 143 NmL CH₄ and CH₄ yields ranging from 113 to 130 mL CH₄ g⁻¹ VS⁻¹ after 11 days of BMP assay.

A method that employs two coupled ADM1 model applications and BMP assay, combined with an iterative optimization method, was developed to characterize sewage sludge and biogas production potential by an equivalent composition that produces similar methanogenic curves.

The approach presented in this investigation can be used to design experiments in batch reactors using sewage sludge as feedstock to produce biogas, and to optimize the biogas production in the large scale biogas plant, which is very important for practical use.

Further studies applying BMP assays and computer simulations of both AR and BMP processes, including flow and particle transport simulations, are recommended for better understanding of the anaerobic digestion process. The results achieved can be used not only to define experiments in batch reactors having sewage sludge as feedstock to produce biogas but also to investigate microbial communities associated with methane production using molecular biology tools. Finally, the combination of BMP tests and biological data will be useful to predict the best conditions to operate anaerobic reactors to produce bioenergy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the constructive contributions from the reviewers that have improved the overall quality of this work.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This research was supported by the Department of Innovation of the Rio de Janeiro State University (UERJ); the State Company of Water and Wastewater (CEDAE); the Carlos Chagas Filho Foundation for Supporting Research in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (Proc. E-26/202.894/2018), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Proc. 308335/2017-1) and the Brazilian Innovation Agency (Finep) (01.19.0087.00). The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Proc. 310955/2022-0) supported the APC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

The Department of Innovation of the Rio de Janeiro State University (UERJ).

The State Company of Water and Wastewater (CEDAE).

The Carlos Chagas Filho Foundation for Supporting Research in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ): Proc. E-26/202.894/2018.

The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq): Proc. 308335/2017-1.

Brazilian Innovation Agency (Finep): 01.19.0087.00.

The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq): Proc. 310955/2022-0.

Competing Interests

Marcia Marques is an Academic Editor for PeerJ.

Author Contributions

- Mariana Erthal Rocha conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Thais Carvalho Lazarino performed the experiments, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Gabriel Oliveira performed the experiments, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Lia Teixeira conceived and designed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Marcia Marques conceived and designed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.

- Norberto Mangiavacchi conceived and designed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The raw data are available in the [Supplemental File](#).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.16720#supplemental-information>.

REFERENCES

- Abdul Aziz NIH, Hanafiah MM, Mohamed Ali MY. 2019.** Sustainable biogas production from agrowaste and effluents—s promising step for small-scale industry income. *Renewable Energy* **132**:363–369 DOI [10.1016/j.renene.2018.07.149](https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.149).
- Achinas S, Euverink GJW. 2016.** Theoretical analysis of biogas potential prediction from agricultural waste. *Resource-Efficient Technologies* **2**:143–147 DOI [10.1016/j.reffit.2016.08.001](https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.08.001).
- Alex J, Benedetti L, Copp J, Gernaey K, Jeppsson U, Nopens I, Pons M, Rosen C, Steyer J, Vanrolleghem P. 2019.** *Benchmark simulation model (2) (BSM2)*. London: International Water Association.
- Allen C, Mazanko A, Abdehagh N, Eberl HJ. 2023.** A new ODE-based julia implementation of the anaerobic digestion model (1) greatly outperforms existing DAE-based java and python implementations. *Processes* **11**:1899 DOI [10.3390/pr11071899](https://doi.org/10.3390/pr11071899).
- Alves IRFS, Mahler CF, Oliveira LB, Reis MM, Bassin JP. 2020.** Assessing the use of crude glycerol from biodiesel production as an alternative to boost methane generation by anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Biomass & Bioenergy* **143**:105831 DOI [10.1016/j.biombioe.2020.105831](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105831).
- Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D, Borzacconi L, Campos JL, Guwy AJ, Kalyuzhnyi S, Jenicek P, Van Lier JB. 2009.** Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology* **59**:927–934 DOI [10.2166/wst.2009.040](https://doi.org/10.2166/wst.2009.040).
- Angelidaki I, Sanders W. 2004.** Assessment of the Anaerobic Biodegradability of Macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **3**:117–129.
- Angelidaki I, Treu L, Tsapekos P, Luo G, Campanaro S, Wenzel H, Kougias PG. 2018.** Biogas upgrading and utilization: current status and perspectives. *Biotechnology Advances* **36**:452–466 DOI [10.1016/j.biotechadv.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.011).
- APHA (American Public Health Association). 2017.** *Standard methods for evaluation of water and wastewater*. 23rd edition. Washington, D.C.: American Water Works Association.
- Astals S, Esteban-Gutiérrez M, Fernández-Arévalo T, Aymerich E, García-Heras JL Mata-Alvarez, J. 2013.** Anaerobic digestion of seven different sewage sludges: A

- biodegradability and modelling study. *Water Research* **47**:6033–6043
DOI [10.1016/j.watres.2013.07.019](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.019).
- Bai X, Chen YC. 2020.** Synergistic effect and supernatant nitrogen reduction from anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Bioresource Technology Reports* **10**:100424 DOI [10.1016/j.biteb.2020.100424](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100424).
- Batstone DJ, Keller J, Angelidaki I, Kalyuzhnyi SV, Pavlostathis SG, Rozzi A, Sanders WTM, Siegrist H, Vavilin VA. 2002.** The IWA anaerobic digestion model no 1 (ADM1). *Water Science and Technology* **45**(10):65–73.
- Batstone DJ, Puyol D, Flores-Alsina X, Rodríguez J. 2015.** Mathematical modelling of anaerobic digestion processes: applications and future needs. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **14**:595–613 DOI [10.1007/s11157-015-9376-4](https://doi.org/10.1007/s11157-015-9376-4).
- Batstone DJ, Virdis B. 2014.** The role of anaerobic digestion in the emerging energy economy. *Current Opinion in Biotechnology* **27**:142–149
DOI [10.1016/j.copbio.2014.01.013](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.013).
- Cabbai V, Ballico M, Aneghi E, Goi D. 2013.** BMP tests of source selected OFMSW to evaluate anaerobic codigestion with sewage sludge. *Waste Management* **33**:1626–1632 DOI [10.1016/j.wasman.2013.03.020](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.03.020).
- Castellano-Hinojosa A, Armato C, Pozo C, González-Martínez A, González-López J. 2018.** New concepts in anaerobic digestion processes: recent advances and biological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:5065–5076
DOI [10.1007/s00253-018-9039-9](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9039-9).
- Catenacci A, Santus A, Malpei F, Ferretti G. 2022.** Early prediction of BMP tests: A step response method for estimating first-order model parameters. *Renewable Energy* **188**:184–194 DOI [10.1016/j.renene.2022.02.017](https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.02.017).
- Chen S, He J, Wang H, Dong B, Li N, Dai X. 2018.** Microbial responses and metabolic pathways reveal the recovery mechanism of an anaerobic digestion system subjected to progressive inhibition by ammonia. *Chemical Engineering Journal* **350**:312–323
DOI [10.1016/j.cej.2018.05.168](https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.168).
- Deng L, Ngo HH, Guo W, Chang SW, Nguyen DD, Pandey A, Varjani S, Hoang NB. 2022.** Recent advances in circular bioeconomy based clean technologies for sustainable environment. *Journal of Water Process Engineering* **46**:102534
DOI [10.1016/j.jwpe.2021.102534](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102534).
- Donoso-Bravo A, Olivares D, Lesty Y, Bossche Vanden, H. 2020.** Exploitation of the ADM1 in a XXI century wastewater resource recovery facility (WRRF): the case of codigestion and thermal hydrolysis. *Water Research* **175**:115654
DOI [10.1016/j.watres.2020.115654](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115654).
- Elbeshbishy E, Nakhla G, Hafez H. 2012.** Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresource Technology* **110**:18–25 DOI [10.1016/j.biortech.2012.01.025](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.025).
- Ferguson RMW, Coulon F, Villa R. 2018.** Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD. *Science of the Total Environment* **642**:754–763
DOI [10.1016/j.scitotenv.2018.06.007](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.007).

- Filer J, Ding HH, Chang S. 2019.** Biochemical methane potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. *Water* **11**:921 DOI [10.3390/w11050921](https://doi.org/10.3390/w11050921).
- García-Gen S, Wouwer AV. 2021.** A model-based optimization strategy for the start-up of anaerobic co-digestion processes. *Renewable Energy* **170**:693–702 DOI [10.1016/j.renene.2021.02.007](https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.02.007).
- Gohil SN, Shilpkar PG, Shah MC, Shah AJ, Acharya PB. 2018.** Methane from human excreta: comparative assessment of batch and continuous biomethanation process. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **12**:2143–2148 DOI [10.22207/JPAM.12.4.52](https://doi.org/10.22207/JPAM.12.4.52).
- Grosser A. 2018.** Determination of methane potential of mixtures composed of sewage sludge, organic fraction of municipal waste and grease trap sludge using biochemical methane potential assays. A comparison of BMP tests and semi-continuous trial results. *Energy* **143**:488–499.
- Grosser A, Neczaj E, Jasinska A, Celary P. 2020.** The influence of grease trap sludge sterilization on the performance of anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Renewable Energy* **161**:988–997 DOI [10.1016/j.renene.2020.07.108](https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.108).
- Guo W, Li D, Zhang Z, Mo R, Peng Y, Li Y. 2023.** A novel approach for the fractionation of organic components and microbial degraders in ADM1 and model validation based on the methanogenic potential. *Water Research* **236**:119945 DOI [10.1016/j.watres.2023.119945](https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119945).
- Holliger C, Alves M, Andrade D, Angelidaki I, Astals S, Baier U, Bougrier C, Buffière P, Carballa M, De Wilde V, Ebertseder F, Fernández B, Ficara E, Fotidis I, Frigon JC, De Lacroix HF, Ghasimi DSM, Hack G, Hartel M, Heerenklage J, Jenicek PHorvathIS, Koch K, Krautwald J, Lizasoain J, Liu J, Mosberger L, Nistor M, Oechsner H, Paterson M, OliveiraJV, Pauss A, Pommier S, Porqueddu I, Raposo F, Ribeiro T, Strömberg SPfundFR, Torrijos M, Van Eekert M, Van Lier J, Wedwitschka H, Wierinck I. 2016.** Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology* **74**:2515–2522 DOI [10.2166/wst.2016.336](https://doi.org/10.2166/wst.2016.336).
- Issah AA, Kabera T, Kemausuor F. 2020.** Biogas optimisation processes and effluent quality: a review. *Biomass & Bioenergy* **133**:105449 DOI [10.1016/j.biombioe.2019.105449](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105449).
- Jiang X, Xie Y, Liu M, Bin S, Liu Y, Huan C, Ji G, Wang X, Yan Z, Lyu Q. 2022.** Study on anaerobic co-digestion of municipal sewage sludge and fruit and vegetable wastes: methane production, microbial community and three-dimension fluorescence excitation-emission matrix analysis. *Bioresour Technol* **347**:126748 DOI [10.1016/j.biortech.2022.126748](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126748).
- Jimenez J, Charnier C, Kouas M, Latrille E, Torrijos M, Harmand J, Patureau D, Sperandio M, Morgenroth E, Beline F, Ekama G, Vanrolleghem PA, Robles A, Seco A, Batstone DJ, Steyer JP. 2020.** Modelling hydrolysis: simultaneous versus sequential biodegradation of the hydrolysable fractions. *Waste Management* **101**:150–160 DOI [10.1016/j.wasman.2019.10.004](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.004).
- Jingura RM, Kamusoko R. 2017.** Methods for determination of biomethane potential of feedstocks: a review. *Biofuel Research Journal* **4**:573–586 DOI [10.18331/BRJ2017.4.2.3](https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.2.3).

- Kafle GK, Chen L. 2016.** Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. *Waste Management* **48**:492–502 DOI [10.1016/j.wasman.2015.10.021](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.10.021).
- Kashi S, Satari B, Lundin M, Horváth IS, Othman M. 2017.** Application of a mixture design to identify the effects of substrates ratios and interactions on anaerobic co-digestion of municipal sludge, grease trap waste, and meat processing waste. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **5**:6156–6164 DOI [10.1016/j.jece.2017.11.045](https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.045).
- Koch K, Hafner SD, Weinrich S, Astals S. 2019.** Identification of critical problems in biochemical methane potential (BMP) tests from methane production curves. *Frontiers in Environmental Science* **7**:178 DOI [10.3389/fenvs.2019.00178](https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00178).
- Labatut RA, Angenent LT, Scott NR. 2011.** Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresource Technology* **102**:2255–2264 DOI [10.1016/j.biortech.2010.10.035](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.035).
- Lavergne C, Jeison D, Ortega V, Chamy R, Donoso-Bravo A. 2018.** A need for a standardization in anaerobic digestion experiments? Let's get some insight from meta-analysis and multivariate analysis. *Journal of Environmental Management* **222**:141–147.
- Lin Q, De Vrieze J, Li C, Li J, Li J, Yao M, Hedenec P, Li H, Li T, Rui J, Frouz J, Li X. 2017.** Temperature regulates deterministic processes and the succession of microbial interactions in anaerobic digestion process. *Water Research* **123**:134–143 DOI [10.1016/j.watres.2017.06.051](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.051).
- Lucas R, Kuchenbuch A, Fetzer I, Harms H, Kleinstaub S. 2015.** Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops. *FEMS Microbiology Ecology* **9**:1–11.
- Ma SJ, Ma HJ, Hu HD, Ren HQ. 2019.** Effect of mixing intensity on hydrolysis and acidification of sewage sludge in two-stage anaerobic digestion: characteristics of dissolved organic matter and the key microorganisms. *Water Research* **148**:359–367 DOI [10.1016/j.watres.2018.10.058](https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.058).
- Maharaj BC, Mattei MR, Frunzo L, Hullebusch EDva, Esposito G. 2019.** ADM1 based mathematical model of trace element complexation in anaerobic digestion processes. *Bioresource Technology* **276**:253–259 DOI [10.1016/j.biortech.2018.12.064](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.064).
- Maragkaki AE, Vasileiadis I, Fountoulakis M, Kyriakou A, Lasaridi K, Manios T. 2018.** Improving biogas production from anaerobic co-digestion of sewage sludge with a thermal dried mixture of food waste, cheese whey and olive mill wastewater. *Waste Management* **71**:644–651 DOI [10.1016/j.wasman.2017.08.016](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.016).
- Mayer F, Gerin PA, Noo A, Foucart G, Flammang J, Lemaigre S, Sinnaeve G, Dardenne P, Delfosse P. 2014.** Assessment of factors influencing the biomethane yield of maize silages. *Bioresource Technology* **153**:260–268 DOI [10.1016/j.biortech.2013.11.081](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.081).
- McCarty PL. 1964.** Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public works* **95**(9):107–112.
- Mustapha NA, Hu A, Yu CP, Sharuddin SS, Ramli N, Shirai Y, Maeda T. 2018.** Seeking key microorganisms for enhancing methane production in anaerobic digestion

- of waste sewage sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:5323–5334
DOI [10.1007/s00253-018-9003-8](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9003-8).
- Nabaterega R, Nazyab B, Eskicioglu C. 2023.** Modification and calibration of anaerobic digestion model 1 to simulate volatile fatty acids production during fermentation of municipal sludge. *Biochemical Engineering Journal* **194**:108886
DOI [10.1016/j.bej.2023.108886](https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108886).
- Owen WF, Stuckev DC, Healv JB, Young LY, Mccagriv PL. 1979.** Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research* **13**:485–492
DOI [10.1016/0043-1354\(79\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90043-5).
- Pan Y, Zhi Z, Zhen G, Lu X, Bakonyi P, Li YY, Zhao Y, Rajesh Banu J. 2019.** Synergistic effect and biodegradation kinetics of sewage sludge and food waste mesophilic anaerobic co-digestion and the underlying stimulation mechanisms. *Fuel* **253**:40–49
DOI [10.1016/j.fuel.2019.04.084](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.084).
- Park M, Kim N, Jung S, Jeong TY Park, D. 2021.** Optimization and comparison of methane production and residual characteristics in mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge by hydrothermal treatment. *Chemosphere* **264**:128516
DOI [10.1016/j.chemosphere.2020.128516](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128516).
- Pearse LF, Hettiaratchi JPA, Da Costa D. 2020.** A new biochemical methane potential assay for landfilled waste using the organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology Reports* **12**:100579 DOI [10.1016/j.biteb.2020.100579](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100579).
- Pilarski K, Pilarska AA, Boniecki P, Niedbała G, Durczak K, Witaszek K, Mioduszewska N, Kowalik I. 2020.** The efficiency of industrial and laboratory anaerobic digesters of organic substrates: the use of the biochemical methane potential correction coefficient. *Energies* **13**:1280 DOI [10.3390/en13051280](https://doi.org/10.3390/en13051280).
- Poggio D, Walker M, Nimmo W, Ma L, Pourkashanian M. 2016.** Modelling the anaerobic digestion of solid organic waste –Substrate characterisation method for ADM1 using a combined biochemical and kinetic parameter estimation approach. *Waste Management* **53**:40–54 DOI [10.1016/j.wasman.2016.04.024](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.04.024).
- Raposo F, Borja R, Ibelli-Bianco C. 2020.** Predictive regression models for biochemical methane potential tests of biomass samples: pitfalls and challenges of laboratory measurements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **127**:109890
DOI [10.1016/j.rser.2020.109890](https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109890).
- Raposo F, De La Rubia MA, Fernández-Cegrí V, Borja R. 2011.** Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: an overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**:861–877.
- Ripoll V, Agabo-García C, Perez M, Solera R. 2020.** Improvement of biomethane potential of sewage sludge anaerobic co-digestion by addition of “sherry-wine” distillery wastewater. *Journal of Cleaner Production* **251**:119667.
- Raposo F, De La Rubia MA, Fernández-Cegrí V, Borja R. 2012.** Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: an overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**:861–877
DOI [10.1016/j.rser.2011.09.008](https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008).

- Rodrigues RP, Rodrigues DP, Klepacz-Smolka A, Martins RC, Quina MJ. 2019.** Comparative analysis of methods and models for predicting biochemical methane potential of various organic substrates. *Science of the Total Environment* **649**:1599–1608 DOI [10.1016/j.scitotenv.2018.08.270](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.270).
- Rosén C, Jeppsson U. 2005.** Aspects on ADM1 implementation within the BSM2 framework. (TEIE; Vol. 7224). Department of Industrial Electrical Engineering and Automation, Lund Institute of Technology. Available at <http://www.iea.lth.se/publications/Reports/LTH-IEA-7224.pdf>.
- Sappl J, Harders M, Rauch W. 2023.** Machine learning for quantile regression of biogas production rates in anaerobic digesters. *Science of the Total Environment* **872**:161923 DOI [10.1016/j.scitotenv.2023.161923](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161923).
- Sillero L, Solera R, Perez M. 2022.** Improvement of the anaerobic digestion of sewage sludge by co-digestion with wine vinasse and poultry manure: effect of different hydraulic retention times. *Fuel* **321**:124104 DOI [10.1016/j.fuel.2022.124104](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124104).
- Strömberg S, Nistor M, Liu J. 2014.** Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management* **34**:1939–1948 DOI [10.1016/j.wasman.2014.07.018](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.018).
- Urtnowski-Morin C, Tanguay-Rioux F, Legros R, Spreutels L. 2021.** Upgrading waste material flow analysis with process models: the case of anaerobic digestion. *Journal of Cleaner Production* **298**:126695 DOI [10.1016/j.jclepro.2021.126695](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126695).
- Vasco-Correa J, Khanal S, Manandhar A, Shah A. 2018.** Anaerobic digestion for bioenergy production: global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. *Bioresour Technol* **247**:1015–1026 DOI [10.1016/j.biortech.2017.09.004](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.004).
- VDI 4630. 2016.** *Fermentation of organic materials - Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests*. Germany: VDI - Association of German Engineers VDI 4630.
- Volschan Junior I, de Almeida R, Cammarota MC. 2021.** A review of sludge pre-treatment methods and co-digestion to boost biogas production and energy self-sufficiency in wastewater treatment plants. *Journal of Water Process Engineering* **40**:101857 DOI [10.1016/j.jwpe.2020.101857](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101857).
- Wang J, Zhang Z, Ye X, Pan X, Lv N, Fang H, Chen S. 2020.** Enhanced solubilization and biochemical methane potential of waste activated sludge by combined free nitrous acid and potassium ferrate pretreatment. *Bioresour Technol* **297**:122376 DOI [10.1016/j.biortech.2019.122376](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122376).
- Weinrich S, Nelles M. 2021.** Systematic simplification of the Anaerobic Digestion Model (1) (ADM1)–Model development and stoichiometric analysis. *Bioresour Technol* **333**:125124 DOI [10.1016/j.biortech.2021.125124](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125124).
- Wickham R, Xie S, Galway B, Bustamante B, Nghiem LD. 2018.** Anaerobic digestion of soft drink beverage waste and sewage sludge. *Bioresour Technol* **262**:141–147 DOI [10.1016/j.biortech.2018.04.046](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.046).

- Xie S, Li X, Wang C, Kulandaivelu J, Jiang G. 2020.** Enhanced anaerobic digestion of primary sludge with additives: Performance and mechanisms. *Bioresource Technology* **316**:123970.
- Xie S, Wickham R, Nghiem LD. 2017.** Synergistic effect from anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **116**:191–197.
- Yi J, Dong B, Jin J, Dai X. 2014.** Effect of increasing total solids contents on anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: performance and microbial characteristics analysis. *PLOS ONE* **9**(7):e102548 DOI [10.1371/journal.pone.0102548](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102548).
- Zan F, Iqbal A, Lu X, Wu X, Chen G. 2022.** Food waste-wastewater-energy/resource nexus: integrating food waste management with wastewater treatment towards urban sustainability. *Water Research* **211**:118089 DOI [10.1016/j.watres.2022.118089](https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118089).
- Zhang Q, Hu J, Lee D. 2016.** Biogas from anaerobic digestion processes: research updates. *Renewable Energy* **98**:108–119 DOI [10.1016/j.renene.2016.02.029](https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.029).
- Zhang W, Wei Q, Wu S, Qi D, Li W, Zuo Z, Dong R. 2014.** Batch anaerobic co-digestion of pig manure with dewatered sewage sludge under mesophilic conditions. *Applied Energy* **128**:175–183.
- Zhao X, Li L, Wu D, Xiao T, Ma Y, Peng X. 2019.** Modified Anaerobic Digestion Model (1) for modeling methane production from food waste in batch and semi-continuous anaerobic digestions. *Bioresource Technology* **271**:109–117 DOI [10.1016/j.biortech.2018.09.091](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.091).
- Zou H, Chen Y, Shi J, Zhao T, Yu Q, Yu S, Shi D, Chai H, Gu L, He Q, Ai H. 2018.** Mesophilic anaerobic co-digestion of residual sludge with different ligno-cellulosic wastes in the batch digester. *Bioresource Technology* **268**:371–381 DOI [10.1016/j.biortech.2018.07.129](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.129).

ANEXO 2



Succession from acetoclastic to hydrogenotrophic microbial community during sewage sludge anaerobic digestion for bioenergy production

Mariana Erthal Rocha · Norberto Mangiavacchi · Marcia Marques · Lia Teixeira

Received: 6 December 2023 / Revised: 6 August 2024 / Accepted: 28 August 2024
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract To assess microbial dynamics during anaerobic digestion (AD) of sewage sludge (SWS) from a municipal Wastewater Treatment Plant (WWTP), a Biochemical Methane Potential (BMP) assay at 37 °C under mono-digestion conditions was conducted. Utilizing the Illumina MiSeq platform, 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequencing unveiled a core bacterial community in the solid material, showcasing notable variations in profiles. The research investigates changes in microbial communities and metabolic pathways to understand their impact on the efficiency of the digestion process. Prior to AD, the relative abundance in SWS was as follows: *Proteobacteria* > *Bacteroidota* > *Actinobacteriota*. Post-AD, the relative abundance shifted to *Firmicutes* > *Synergistota* > *Proteobacteria*, with *Sporanaerobacter* and *Clostridium* emerging as dominant genera. Notably, the methanogenic community underwent a metabolic pathway shift from acetoclastic to hydrogenotrophic in the lab-scale reactors. At

the genus level, *Methanosaeta*, *Methanolinea*, and *Methanofastidiosum* predominated initially, while post-AD, *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, and *Methanospirillum* took precedence. This metabolic transition may be linked to the increased abundance of *Firmicutes*, particularly *Clostridia*, which harbor acetate-oxidizing bacteria facilitating the conversion of acetate to hydrogen.

Keywords Anaerobic digestion · Archaeal community · Biochemical methane potential · 16S rRNA · Sewage sludge · Wastewater treatment plant

Introduction

Sewage sludge (SWS) generation and disposal have become one of the greatest sanitary challenges of the twenty-first century (Nascimento et al. 2018). As a by-product of biological wastewater treatment, SWS generation is facing a dramatic increase with the population growth and the continuous improvement in the wastewater treatment facility (Guo et al. 2023). In some regions with insufficient sewerage and wastewater treatment facilities SWS is discharged directly into receiving water bodies. In 2020, the volume of municipal wastewater generated annually worldwide was estimated to be 360–380 cubic kilometres, with prediction of a 24% increase by 2030 and a 51% increase by 2050 (Giacomo and Romano 2022). Feng et al (2023) estimated that the annual global

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10529-024-03528-6>.

M. E. Rocha (✉) · N. Mangiavacchi
 Department of Mechanical Engineering, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil
 e-mail: marianaerthalrocha@gmail.com

M. E. Rocha · M. Marques · L. Teixeira
 Department of Sanitary and Environmental Engineering,
 Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

production of SWS may rise from 53 million tons dry solids in 2023 to 160 million tons if the wastewater generated globally is to be treated to a similar level as in the 27 European Union countries/UK. As the production of SWS increases, there is a corresponding rise in the energy demand for its treatment (Ferrentino et al. 2023).

As a renewable energy, biogas has been proved to be a feasible alternative to fossil fuels, since it can contribute to slow down the non-renewable energy exhaustion (Fu et al. 2023) and is considered one of the key environmental technologies that can provide affordable, sustainable, and secure energy (Garlicka et al. 2023). Several investigations have been conducted to improve the SWS anaerobic digestion (AD), specially to: enhance biogas/methane yields (Gu et al. 2020; Nguyen et al. 2021; Tao et al. 2020a, b); for nutrient rich digestate production; inactivating pathogens; decreasing the abundance of antibiotic resistance genes and; degrading emerging contaminants (Liew et al. 2022; Li et al. 2022).

The biochemical methane potential (BMP) assay is defined as a measure of substrate biodegradability determined through the cumulative CH_4 production from an organic material anaerobically incubated and monitored over time (Hafner et al. 2020; Holliger et al. 2021; Raposo et al. 2011; VDI 4630 2016). This methodology is widely used to test the degradability of different organic wastes and it is considered a suitable method to compare the degradability of different substrates in bench scale (Lavergne et al. 2018).

It is well-known the complex process of AD is based on close interactions between numerous microorganisms (MO), which degrade organic polymers in a sequence of steps involving hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis, resulting in methane (CH_4), carbon dioxide (CO_2) and water production (Angelidaki et al. 2018).

Microbial methanogenesis activity has been widely studied in bench scale systems. Methanogenic archaea can produce CH_4 in anaerobiosis through different biochemical pathways, but mainly using acetoclastic and hydrogenotrophic metabolisms (Cai et al. 2021). Methanogenic archaea are specialized in using different substrates, such as hydrogen (H_2), methanol and acetate, to produce CH_4 . Each metabolic pathway creates a unique environment able to provide syntrophic relations with fermenters bacteria in a complex microbiome (Zhu et al. 2020). Several MO such as *Methanobacterium*

sp., *Methanosarcina* sp., *Methanococcus* sp., *Methanosaeta* sp., and *Methanospirillum* were isolated from different ecological systems and identified for their contribution to biogas production (Tao et al. 2020a, b).

In recent decades, culture-independent molecular biological techniques have made considerable contributions to describe the microbial communities involved in biological processes, mainly by targeting the 16S rRNA gene (Walter et al. 2019). Advances in next-generation sequencing (NGS) technologies have revolutionized the field of environmental microbiology. NGS platforms now enable the retrieval of an unprecedented amount of DNA sequence directly from environmental samples, providing a cost-effective and precise representation of microbial diversity (Treu et al. 2018).

This investigation sought to advance our understanding of microbial community dynamics in SWS digestion, particularly in the context of AD processes, which play a crucial role in wastewater treatment plants (WWTPs). While previous studies have indeed explored microbial communities in AD, this research introduces several novel components that contribute to the current scientific knowledge.

Firstly, the study focuses on the specific context of a municipal WWTP in Rio de Janeiro, Brazil, which may harbour unique microbial populations due to regional environmental factors and operational conditions. Understanding microbial communities in diverse geographical locations is essential for developing tailored strategies for wastewater treatment.

Secondly, the investigation employs Illumina MiSeq technology, a state-of-the-art high-throughput sequencing method, to characterize the taxonomic composition of both bacteria and archaea communities.

Thirdly, the study evaluates microbial community dynamics before and after AD in BMP reactors. This temporal analysis provides insights into how microbial communities adapt and evolve in response to AD conditions, shedding light on the ecological processes underlying AD performance and efficiency.

Methodology

BMP configuration and sampling

SWS were taken from an anaerobic digester at a large municipal WWTP in Rio de Janeiro city/ Brazil. The

WWTP has capacity to treat 7,400 m³day⁻¹. The hydraulic retention time (HRT) of the anaerobic reactor is 28 days. It currently treats 2.5 m³s⁻¹ of wastewater and serves a population equivalent to 1.5 million inhabitants.

The BPM assay was carried out according to previous studies by Angelidaki et al (2009), Hafner et al (2020) and the German Guideline for Fermentation of Organic Materials (VDI 2016), to evaluate CH₄ production from SWS in bench-scale. The methodology for assembling the BMP and validating the system are found in detail in our previous publication (Rocha et al. 2024).

The experiment was conducted in 3 replicates (n=3) incubated during 11-days, when daily CH₄ production during three consecutive days is <1% of the accumulated CH₄ volume (Holliger et al. 2021) under mesophilic conditions (37 ± 0.1 °C) using water bath and digestion bottles of 250 mL (total volume) and 100 mL (working volume). The reactors were called R1, R2 and R3 before AD and R4, R5, R6 post-AD.

The 3 SWS samples were kept in 1 L Schott bottles and immediately taken to the laboratory to set up the BMP assays (Table 1). SWS initial and final values for the main physicochemical parameters (Table 2) were measured according to Standard Methods Protocol (APHA 2017) as shown in our previous publication (Rocha et al. 2024).

Chemical oxygen demand (COD) analyses were conducted with a Shimadzu UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer and the alkalinity through potentiometric titration. The pH was measured with MS Tecnonon model Mpa210 meter and the temperature was recorded with a digital thermometer. The gravimetric method in the analytical scale Gehaka AG200 was used. Total organic carbon (TOC) was analysed using Shimadzu Total Organic Carbon Analyzer TOC 5000A. The SWS used in the assays (100 mL in each assay) played the role of both inoculum and substrate.

Table 1 BMP assay operational

| Parameters | Value |
|-----------------|-------------|
| Temperature | 37 ± 0.1 °C |
| Manual stirring | Twice daily |
| Reactor volume | 250 mL |
| Sewage sludge | 100 mL |

Table 2 Sewage sludge (SWS) physicochemical

| Characterization | | | |
|------------------|--------------------------------------|---------------|--------------|
| Parameters | Unity | Before AD | Ater AD |
| pH | - | 7.43 ± 0.1 | 7.60 ± 0.1 |
| TS | % | 2 | 1 |
| TVS | % | 1.1 | 0.7 |
| VSS | % | 0.8 | 0.5 |
| TCOD | mg L ⁻¹ | 21,903 ± 1002 | 16,502 ± 598 |
| Alkalinity | mg CaCO ₃ L ⁻¹ | 2,382 ± 102 | 2,232 ± 101 |
| TOC | mg L ⁻¹ | 895 ± 102 | 789 ± 100 |

TS total solids; TVS total volatile solids; VSS volatile suspended solids; TCOD total chemical oxygen demand; TOC total organic carbon

All parameters were measured in each replicate and the values are presented as mean value and standard deviation.

The BMP bottles were sealed with a silicone stopper. To prevent gas leakage, caps and connectors were sealed with high vacuum grease. To purge the existing O₂, N₂ gas was flushed into the bottle's headspace for 2 min. The BMP units sealing was checked with the aid of a high-pressure pump, a differential dual port piezoresistive pressure transducer MPX5050DP, a Fluke multimeter and an Arduino data logger. The bottles were gently shaken manually twice a day to prevent particle retention and to avoid clogging in the system.

Note: Tables 1 and 2.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from the samples using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The DNA was quantified with a nanodrop ND-1000 spectrophotometer, and its yield and purity were documented (characterized by the absorption ratio of 260/280 nm). To verify the integrity of the extracted DNA, a 5 µL aliquot of the sample was subjected to electrophoresis at 80 Volts in agarose gel (0.8%) for two hours. The gel was stained for approximately 15 min in ethidium bromide solution (2 µg/mL) and observed on a transilluminator with ultraviolet light.

Microbial communities in both stages (at the beginning and the end of the 11-days of AD) in the

BMP assays were characterized using 16S rRNA marker gene. Sampling replicates were carried out in both stages of the experiment and the results were compared to evaluate adaptation and specialization of the microbial consortia during the AD.

Library preparation and sequencing analysis

The libraries were prepared following the Illumina recommendations. Primers were used for locus-specific amplification of bacteria flank the locus-specific region. Overhang sequence of adapters was included in locus-specific primers. The following Illumina linker sequences (locus-specific sequence) were hybridized to the sequences immobilized on the sequencing slide:

- i. forward overhang: 5'-TCGTCGGCAGCGTCA GATGTGTATAAGAGACAG-
- ii. reverse overhang: 5'-GTCTCGTGGGCTCGG AGATGTGTATAAGAGACAG-

Sequencing was conducted using the Illumina Miseq system, resulting in paired end reads of 250 base pairs each. Initially, a polymerase chain reaction (PCR) was carried out to selectively amplify locus-specific regions of 16S rRNA. Following this, AMPure XP beads were employed to purify the PCR products, and the size distribution of the resulting fragments was assessed through agarose gel electrophoresis. Subsequently, a second PCR step was performed to incorporate barcodes from the Nextera XT kit, and additional PCR purification and library validation steps were executed. Next, the libraries were quantified, ensuring that all samples/ libraries were combined in equimolar proportions into a unified pool. To introduce sequencing diversity, a heterogeneous control in the form of the phi-X phage was blended with the amplicon pool. Finally, denaturation of both the libraries and the phi-X control was carried out to facilitate the sequencing process.

Data analysis

Multiplexed reads were assigned on biological samples. The DADA2 program (Callahan et al. 2016), an open-source package implemented in the R language, was used to model and correct amplicon errors. The DADA2 package has a complete pipeline

implemented to transform the sequencer's fastq files into inferred, disassembled, and chimera-free sample sequences. Filtering of fastq files was performed to cut the PCR primer sequences and filter the 3' ends of the reads due to quality decay ($Q < 30$).

After filtering, the reads had a size of 2×250 bp, keeping the overlap for later joining the readings and reassembling the fragment. The DADA2 algorithm makes use of a parametric error model, and each amplicon dataset has a different set of error rates. The learnErrors method learns this error model from the data, alternating between estimating error rates and inferring sample composition until they converge on a consistent solution. As with many machine learning problems, the algorithm must start with an initial guess, for which, the maximum possible error rates on that data are used (the error rates if only the most abundant sequence is correct and everything else is errors). For greater accuracy, the error is estimated with component samples from the entire sequencing run. Then, the denoising step is performed to obtain a detailed list of unique sequences and their abundances and produce consensus position quality scores for each unique sequence, averaging the positional qualities of the component reads.

After the initial processing of the sequencing data by DADA2, taxonomies were assigned to each amplicon sequencing variants (ASV) using a DADA2 program implementation of the naive Bayesian classifier method for this purpose. The assignTaxonomy function takes as input a set of sequences (ASVs) to be classified and a training set of reference sequences with known taxonomy and assigns taxonomies. The Silva 138.2 database was used as a reference. The taxonomic classifications, and their quantifications, generated by DADA2 were imported into the Phyloseq program (McMurdie and Holmes 2013), and implemented in R. ASVs that were not classified at least up to the family level were filtered out, and ASVs assigned the same genus were clustered.

Results and Discussion

Physicochemical analysis

In our previous publication (Rocha et al. 2024), we presented the results of the assembly and validation of bench-scale bioreactors with the insertion

of experimental parameters to feed a theoretical model for AD (the ADM1 model), and the subsequent mathematical model validation and calibration for SWS AD biogas yield from a WWTP. The bench-scale BMP assays had a methane gas cumulative production of 136 ± 7.5 Nml CH_4 and a yield of 124 ± 6.23 mL CH_4 g^{-1} VS $^{-1}$. Similar results for SWS mono-digestion methane production in experimental assays (138.2, 121, 124.4 mL CH_4 g^{-1} VS $^{-1}$) are found in scientific publications by Alves et al (2020), Kashi et al (2017) and Pan et al (2019), respectively.

Physicochemical analysis (Table 2) shows pH values (7.43 ± 0.1 in the beginning and 7.60 ± 0.1 after AD) within the range expected due to the growth of MO and biogas production in all reactors without the addition of a buffer solution.

TOC values measured before and after the experiment (895 ± 102 and 789 ± 100 mg L^{-1} respectively) refers to the organic carbon content in the SWS and indirectly reflects the content of organic matter (OM) (Zhu et al. 2020). The high-temperature combustion applied in the TOC method has been reported to be reliable with higher oxidation rates of various types of OM (Park et al. 2021). The OM in the system may be relatively stable and resistant to degradation or alteration under the experimental conditions. Microbial processes, such as decomposition and assimilation of OM, could have reached an equilibrium, which maintains the overall OM content even if there are fluctuations in the TOC values.

The alkalinity values measured before and after AD (2382 ± 102 and 2332 ± 101 mg CaCO_3 L^{-1} respectively) (Table 2) indicates the sludge capability of buffering the reaction. High values for alkalinity possibilities that the reaction is buffered, so the pH tends to not undergo major changes (Campanaro et al. 2020).

The SWS TCOD values (Table 2) in the beginning and after 11 days of AD ($21,903 \pm 1,002$ mg L^{-1} and $16,502 \pm 598$ mg L^{-1} respectively) could indicate that a significant portion of the OM is converted into gases, primarily CH_4 and CO_2 , which are released from the system.

Serna-García et al (2020) and Xie et al (2020) found similar values for SWS TCOD from WWTPs ($22,430 \pm 1190$ and $20,400 \pm 1050$ mg L^{-1} , respectively). In relation to TCOD reduction, our study presented 24.66% and other studies with BMP tests (Kashi et al. 2017; Maragkaki et al. 2018 and Zhang

et al. 2016) obtained similar values: 16%, 28.6%, and 25.22% respectively.

The stability of TOC and the reduction in COD can coexist if part of the OM in the sample has been transformed into products (such as gases or insoluble compounds) that are not detected by the COD method. This can occur due to the diverse nature of organic compounds in the sample and the possible limited capacity of the COD method to detect all types of oxidizable OM.

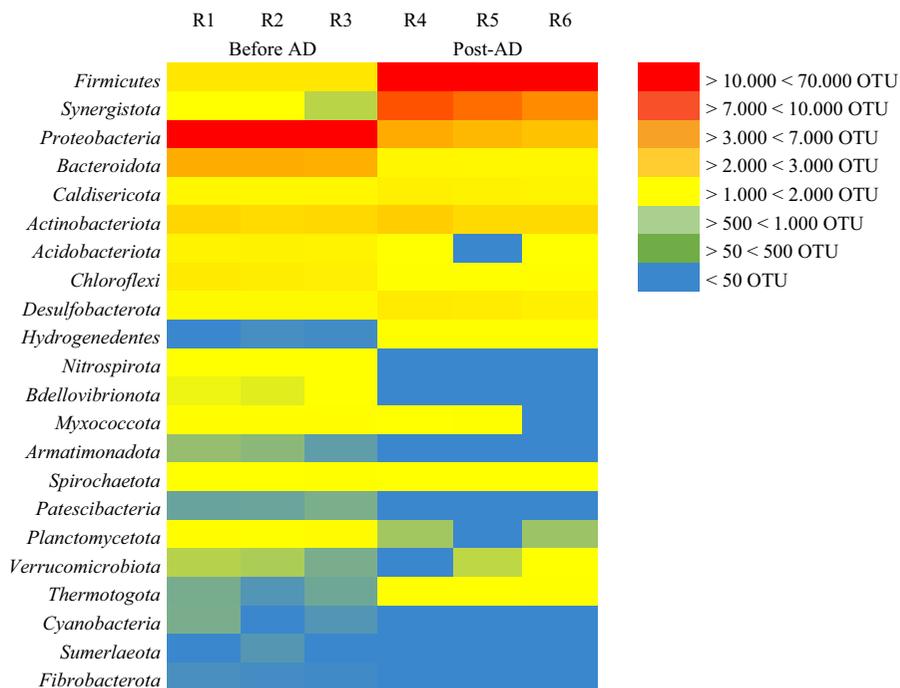
Total solid (TS), total volatile solids (TVS) and volatile suspended solids (VSS) presented a reduction after AD from 2.0 ± 0.26 to $1.0 \pm 0.13\%$, 1.1 ± 0.11 to $0.7 \pm 0.09\%$, and 0.8 ± 0.10 to $0.5 \pm 0.08\%$, respectively. These results suggest that there is a greater proportion of organic compounds compared to inorganic compounds in the SWS. The reduction observed in the organic fraction during AD, indicates that a substantial portion of the sludge consists of OM that is susceptible to microbial degradation.

Bacterial biodiversity at phylum level

The microbial community profile of the SWS varied before and after the AD process, which means the microbial structure in these BMP reactors were affected during the process (Fig. 1, Fig. 2 and Supplementary Files). AD needs a complex microbial community and specific nutrients in the substrates to promote methanogenic activity (Yang et al. 2016). The AD assays conducted revealed high bacterial and archaeal diversity.

Clear changes were observed in the bacterial diversity after 11 days of the experiment. The most represented phyla in terms of Operational Taxonomic Units (OTU) in the sludge before AD were: *Proteobacteria* (10,667–15,248 OTU, 52.5%–66.1%) > *Bacteroidetes* (3544–4943 OTU, 17.2%–21.8%) > *Actinobacteriota* (1799–2495 OTU, 8.6%–11.1%) > *Firmicutes* (1082–1619 OTU, 5.5%–6.7%) > *Chloroflexi* (970–1183 OTU, 4.1%–5.9%). At the end of the BMP assays bacterial community changed the relative abundance and a new dominance community configuration emerged in the system as following: *Firmicutes* (52,648 OTU–65,368 OTU, 54.3%–78.4%) > *Synergistota* (6980 OTU–8182 OTU, 7.5%–9.6%) > *Proteobacteria* (3530 OTU–4010 OTU, 3.6%–4.7%) > *Actinobacteriota* (2103 OTU–2235 OTU,

Fig. 1 Bacterial Phylum Heatmap variations in OTUs numbers represented by colours



2.5%–2.7%) > *Desulfobacterota* (913–1077 OTU, 1.6%) (Fig. 1). This profile has been consistently reported in previous studies, suggesting there is a general and consistent signature of the AD microbiome (Abendroth et al. 2015; Gao et al. 2022; Goux et al. 2015; Treu et al. 2018).

By analysing the resulting chord diagram (Fig. 2) insights into the connections and patterns among the entities/categories, identify a connection between phylum *Firmicutes* and *Synergistes* related with AD process (R4, R5 and R6). Major variety of bacterial phylum was also observed before AD (R1, R2 and R3) with an increase in terms of number of organisms after AD and phylum variety reduction.

At the phylum level, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi* and *Proteobacteria* are the main bacteria in WWTP SWS in which, *Firmicutes* and *Bacteroidota* are the most common in AD reactors, affecting the degree of substrate fermentation (Gao et al. 2022; Jiang et al. 2022; Nascimento et al. 2018; Schneider et al. 2021). *Chloroflexi* and *Proteobacteria*, also corroborate with the complex environment associated with SWS, where microbial diversity adjusts to the characteristics of each reactor type, local climatic conditions, and operational parameters (Al Ali et al. 2020; Saha et al. 2020).

Firmicutes are frequently reported in anaerobic sludge treatment systems (Yang et al. 2014) and are recognized for its metabolic versatility, enabling them to degrade a variety of substrates (Li et al. 2022). In AD, they actively participate in hydrolytic and acidogenic steps (Zhu et al. 2020), producing volatile fatty acids (VFA), an important substrate for AD development (Nascimento et al. 2018). They can produce cellulases, lipases, proteases and other extracellular enzymes that carry out the degradation of several substrates, including protein, lipids, lignin, cellulose, sugars and amino acids (Qin et al. 2021). This group is a well-described fermenting bacterium often developing syntrophic cooperation with methanogens, by degrading butyrate and its analogues (Garcia-Peña et al. 2011). The H_2 released in the process is scavenged by methanogens, making the reaction thermodynamically possible for both partners (Walter et al. 2019). Within the phylum *Firmicutes*, *Clostridia* is the major class, accounting for $95.5 \pm 2.32\%$ of *Firmicutes* reads.

Bacteroidetes are one of the primary populations participating in hydrolysis and fermentation in SWS carbohydrates. This group is known to play several roles in AD, been reported as sugar fermenters and plant cellulose degraders (Yang et al. 2016). Protein

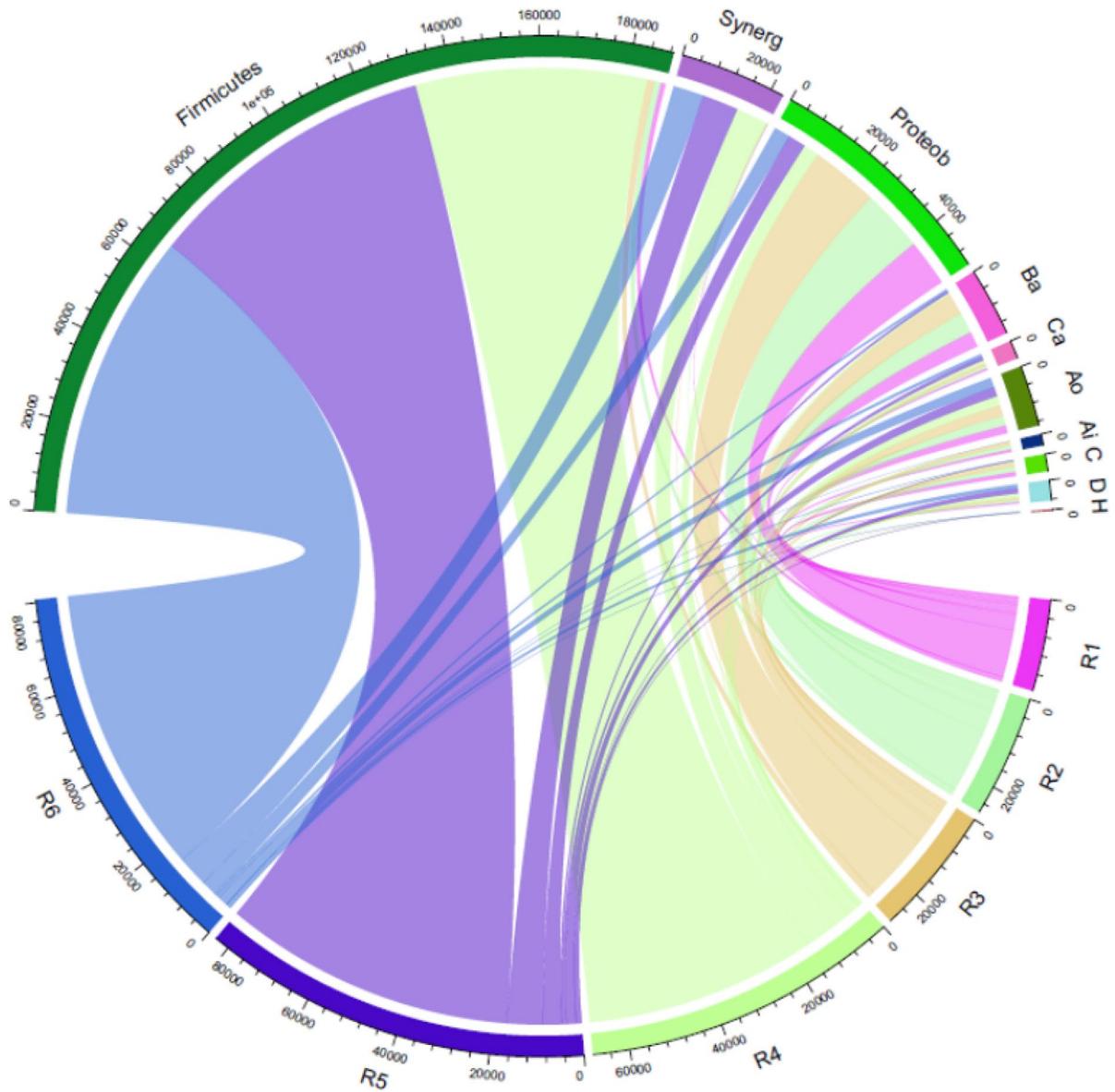


Fig. 2 Bacterial Phylum Chord Diagram related to reactors R1, R2 and R3 (before AD) and R4, R5 and R6 (post-AD). The 10 most representative Phylum groups: *Firmicutes*, *Sin-*

ergy: Synergistota, *Proteob: Proteobacteria*, *Ba: Bacteroidota*, *Ca: Caldisericota*, *Ao: Actinobacteriota*, *Ai: Acidobacteria*, *C: Chloroflexi*, *D: Desulfobacterota* and *H: Hydrogenedentes*

degradation and amino acid fermentation to acetate, propionate and succinate have been documented among species (Kampmann et al. 2012).

Proteobacteria (52.5–66.1% prior to AD and 3.6–4.7% post-AD) is a highly diverse bacteria phylum with significant metabolic capacity, actively participating in the carbon, nitrogen, sulphur, and phosphorus cycles (Meyer et al. 2016). *Proteobacteria*

contributes to all AD steps, producing a broad range of fermentation products (Cai et al. 2016), they also contribute to all metabolic pathways involved in OM degradation (Jiang et al. 2019a, b). The decrease in *Proteobacteria* post-AD in reactors R4, R5 and R6 could be attributed to the strict anaerobic environmental conditions and microbiological interactions within the system. Some possible explanations refer

to microbial competition for available substrates, adaptation to anaerobic conditions in which, some species of *Proteobacteria* may not be well adapted to strict anaerobic environments and therefore, may decrease in number over time as the system stabilizes anaerobically.

Hydrogenedentes is a recently proposed phylum of bacteria, previously known as NKB19. This phylum increased 7 to 10% post-AD. Genetic analyses of the sequences extracted from the environment suggest these organisms play an important role in nitrogen reduction, sulphite oxidation, sulphate reduction and homoacetogenesis (Momper et al. 2018). They are syntrophic bacteria that can transfer molecular H₂ (Dyksma and Gallert 2022) and they can also be related to glycerol and lipids degradation in detrital biomass (Nobu et al. 2015).

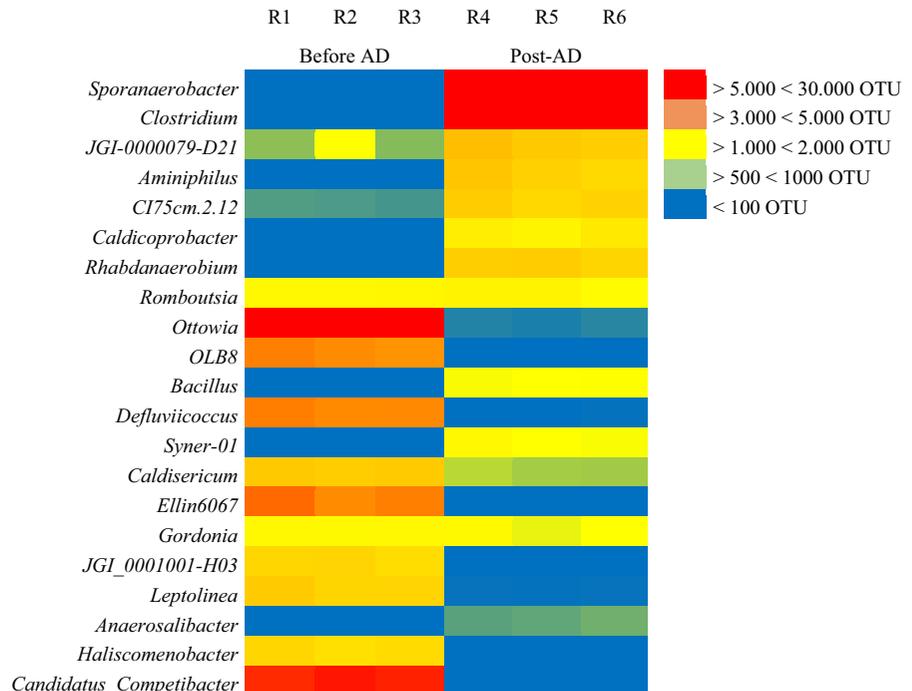
The metabolic potential of the phylum *Chloroflexi* is still unclear, but several studies suggest a role in carbohydrate degradation (Campanaro et al. 2018). Zhou et al (2023) made statistical analysis to uncovers significant correlations between process parameters, dominant bacterial phyla and archaeal genera. The results indicate that *Firmicutes* exhibit negative correlations with *Proteobacteria* and *Chloroflexi*, which make sense in the present study.

Microbial diversity at genus level

At genus level, the most representative groups (Fig. 3) at the end of AD in terms of OTU and relative abundance where *Sporanaerobacter* (29,013–36,689 OTU, 43%–47%) followed by *Clostridium* (16,208–20,451 OTU, 19%)—both from Class *Clostridia*; JGI-0000079-D21 (2785–3166 OTU, 3.4%–4.1%) and *Aminiphilus* (2380–2874 OTU, 2.9%–3.7%) from Class *Synergistia*; CI75cm.2.12 from Class *γ-Proteobacteria* (2421–2619 OTU, 3.1%–3.5%), *Rhabdanaerobium* (2356–3035 OTU, 3.1%–3.6%), *Caldicoprobaacter* (1454–1839 OTU, 1.9%–2.3%) and *Romboutsia* (1244–1638 OTU, 1.5%–1.9%) from Class *Clostridia*, Syner-01 (1081–1237 OTU, 1.3%–1.6%) from Class *Synergistia*, *Gordonia* (1102–1133 OUT, 1.3%–1.6%) from Class *Actinobacteria*.

The abundance of all these groups exponentially increased with AD, some of them in the beginning had an abundance < 100 OTU, such as *Sporanaerobacter*, *Clostridium*, JGI-0000079-D21, *Aminiphilus* from, CI75cm.2.12, *Rhabdanaerobium*, *Caldicoprobaacter* and *Syner-01*. Two groups (*Romboutsia* and *Gordonia*) presented 100 < OTU < 200.

Fig. 3 Microbial Genus Heatmap by OTU



The most abundant genus in the beginning of the operation was *Ottowia* (2851 OTU), *Candidatus Competibacter* (1933 OTU), *Ellin6067* (1480 OTU) both from Class γ -Proteobacteria. *Defluviicoccus* (1379 OTU) from Class α -Proteobacteria and *OLB8* (1271 OTU) from Class Bacteroidia.

Changes between communities were expected, as each one of them plays a different role in specific functions throughout each stage of AD. The *Sporanaerobacter* and *Clostridium* high increase post-AD could be related to competition between α - and γ -Proteobacteria glycogen accumulating organisms for acetate.

Sporanaerobacter is a glucose-to-acetate fermenter that produces H₂ and CO₂ as the main end products (Hernandez-Eugenio et al. 2002). During the degradation of organic compounds, *Sporanaerobacter* generates acetate as a metabolic by-product.

Clostridium is represented as Gram-positive bacteria responsible for degradation of organic compounds and is related to the hydrolysis of complex biopolymers (Zhao et al. 2019). High abundance of *Clostridium* in domestic sludge is expected since it represents 10–40% of human intestinal microbiota (Lopetuso et al. 2013). *Clostridium* is commonly the most abundant genera in sludges from WWTPs (Arelli et al. 2021).

The genus *Aminiphilus* is also strictly anaerobic and mesophilic. This genus ferments peptide compounds, amino acids, malate, fumarate, glycerol, pyruvate releasing acetate, propionate and branched-chain fatty acids. Carbohydrates are not used by this group (Díaz et al. 2007).

The *Sporanaerobacter* and *Clostridium* presence in the reactors post-AD contributed significantly to

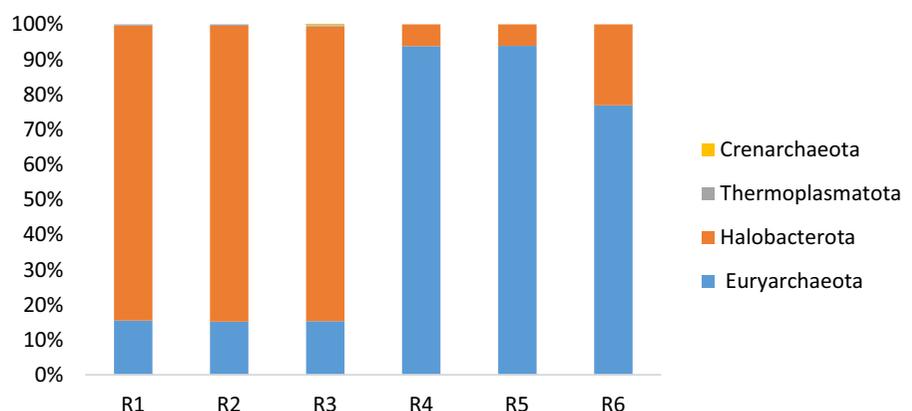
the ecosystem robustness and stability. By occupying various functional niches, these generalist microbes ensured that essential metabolic processes continue unabated, thus safeguarding the overall efficiency and resilience of the reactor ecosystem. Consequently, the presence of such generalist microbial communities represents a vital component in ensuring the sustained functionality and adaptability of AD systems. Generalist groups can perform similar ecological functions in a reactor and this redundancy ensures that even when the environmental conditions change, the ecosystem will stay functional, because its functional niches are occupied (Krohn et al. 2022; Zhu et al. 2020).

Archaeal community

The most representative archaeal community at phylum level was expressed in terms of relative abundance (Fig. 4) by *Euryarchaeota* (15.0% before AD; 76.94 to 93.96% after AD) and *Halobacterota* (84.0% before AD; 6.0 to 23.0% after AD). Phylum *Thermoplasmatota* and *Crenarchaeota* (0.4%, 0.2%, respectively before AD) represent the minority in the beginning of the experiment, with no detection of these groups after AD.

At Genus level (Figs. 5 and 6) the dominance of methanogenic groups before AD was represented by *Methanosaeta* (32,328–34,497 OTU, 43.12%–54.52%) > *Methanolinea* (14,747–16,261 OTU, 19.7%–25.7%) > *Methanofastidiosum* (6467–7032 OTU, 8.6%–11.1%) > *Methanospirillum* (3277–3987 OTU, 4.4%–6.3%) > *Methanosarcina* (1521–1782 OTU, 2.0%–2.8%) > *Methanobrevibacter* (1213–1471 OTU, 1.6%–2.3%). Post-AD the dominance shifted to *Methanobacterium* (33,995–62,398

Fig. 4 Methanogenic community relative abundance at Phylum level. R1 to R3 (before AD) and R4 to R6 (post-AD)



OTU, 76.5%–93.7%) > *Methanosaeta* (1516–2617 OTU, 3.9%–4.2%) > *Methanospirillum* (497–9382 OTU, 1.5%–17.9%).

The chord diagram results (Fig. 6) make clear the connections and patterns between AD and *Methanobacterium* in these reactors and the dominance of this group above others (*Methanosaeta*, *Methanolinea*, *Methanosarcina*). Therefore, a major variety of archaeal genera (*Methanofastidiosum*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*, *Methanolinea*) coexisting before AD was followed by an increase in terms of number of organisms (especially *Methanobacterium*) after AD, but a reduction observed in the variety of genus.

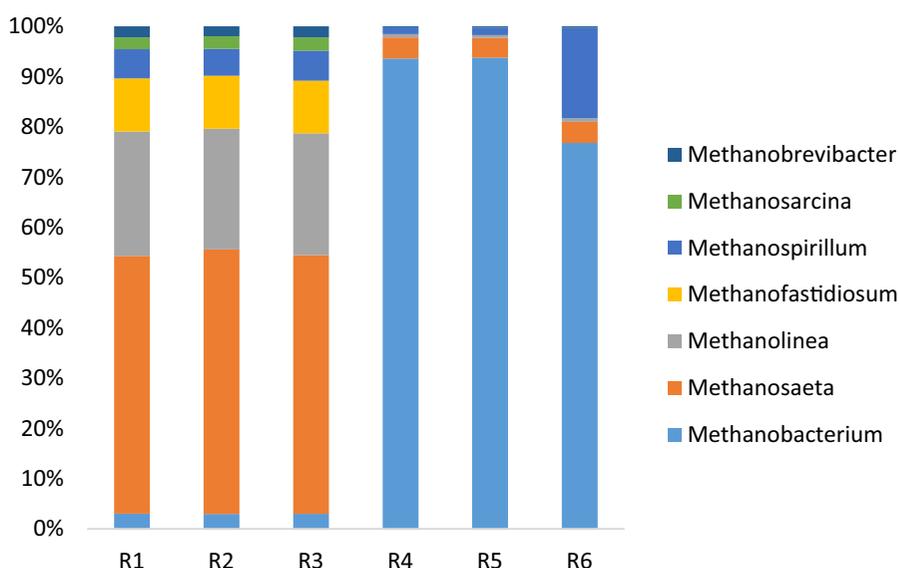
Methanosaeta is an obligate acetoclastic methanogen, which produces CH₄ using acetate (Conklin et al. 2006; Pan et al. 2016). This is a versatile genus that can utilize acetate, methylamines, methanol, and H₂/CO₂ for methanogenesis (Zhang et al. 2021) and keeps its robustness even when operational conditions are not stable. It is worth to mention that high concentrations of ammonia and salt, as well as changes in temperature are often deleterious for methanogenic activity (Jiang et al. 2019a, b).

The hydrogenotrophic *Methanobacterium* genus showed a significant increase in abundance in the reactors, with the acetoclastic *Methanosaeta* following as the second-most abundant group. Similar shifts in the dominant methanogens from *Methanosaeta* to *Methanobacterium* and *Methanosarcina* have been

observed in other studies of SWS anaerobic digestion (Cai et al. 2022; Zhang et al. 2019). This shift in microbial community diversity can also result in a change in the metabolic pathway for methane production, from the acetoclastic to the hydrogenotrophic pathway, as observed in other studies (Cai et al. 2022; Pan et al. 2021).

Homoacetogenic bacteria, strict anaerobes that produce acetate as their only metabolic by-product, and acetate-oxidizing syntrophs (SAOB) regulate AD through acetate producing and acetate consuming, cooperating with acidogenesis and with fatty acids oxidizing bacteria (Zeng et al. 2024). They cooperate with acidogenic bacteria and those that oxidize fatty acids, and they establish a syntrophic relationship with acetoclastic methanogenic archaea (Lv et al. 2023). However, CH₄ can also be produced through syntrophic interactions between SAOB and hydrogenotrophic methanogenic archaea (HM). The interactions between these functional microbes are quite complex, but the microbial conversions and interactions in an anaerobic digestors offer flexibility to overcome stress under different environment disturbances. The SAO-HM process can replace acetoclastic methanogenesis in some environments where the activity of acetoclastic methanogens is inhibited (Pan et al. 2021; Wang et al. 2022). This could happen due to different possible situations, such as: (i) syntrophic relationships, where certain bacteria oxidize acetate (CH₃COO) to H₂ and CO₂ in syntrophic relationships

Fig. 5 Methanogenic community relative abundance at genus level. R1 to R3 (before AD) and R4 to R6 (post-AD)



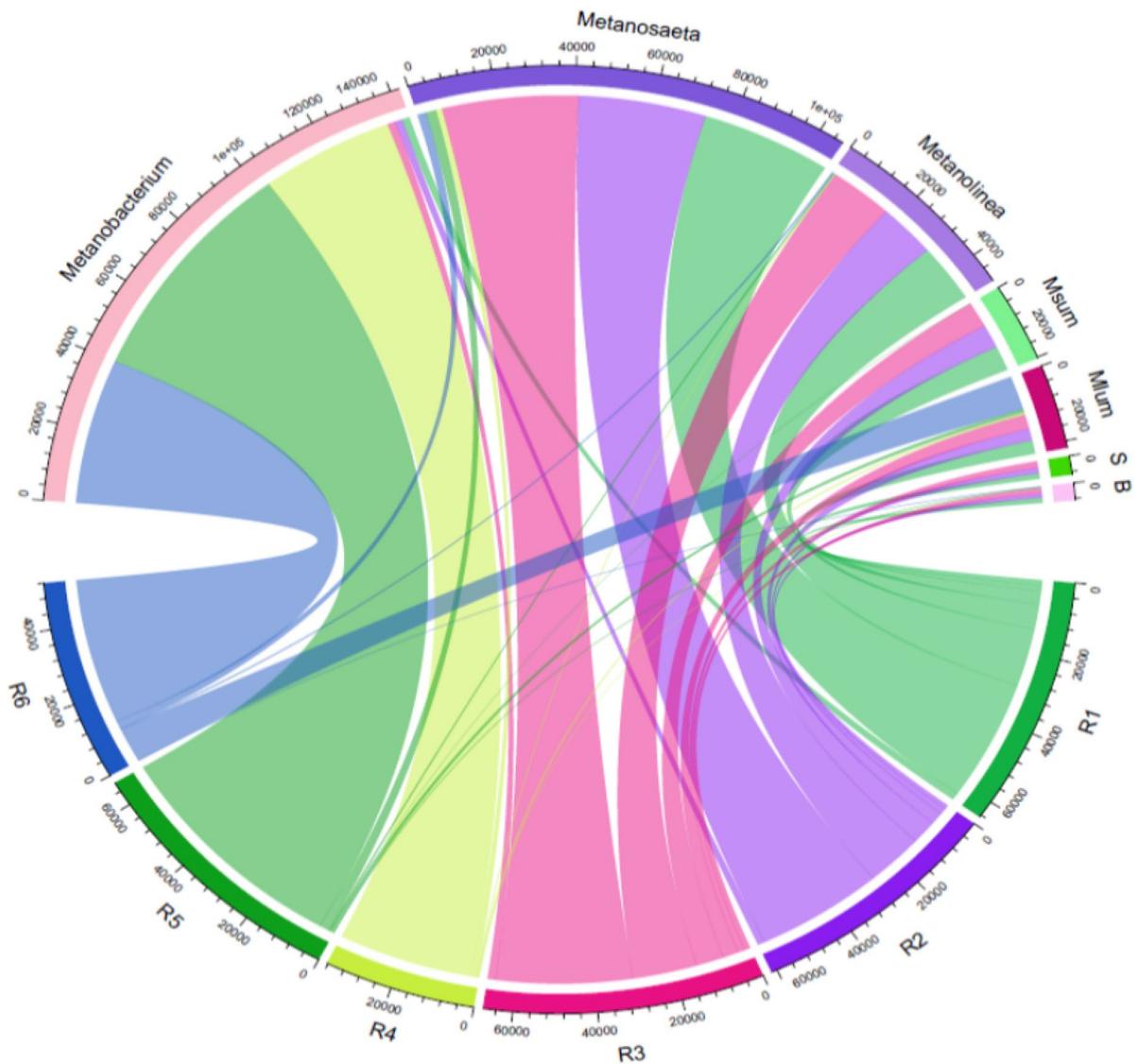


Fig. 6 Methanogenic community at genus level Chord Diagram related to reactors R1, R2 and R3 (before AD) and R4, R5 and R6 (post-AD). The seven most representative groups

were: *Methanobacterium*; *Methanosaeta*; *Methanolinea*; *Msum*: *Methanofastidiosum*; *Mlum*: *Methanospirillum*; *S*: *Methanosarcina* and *B*: *Methanobrevibacter*

with HM; this syntrophic acetate oxidation allows for the conversion of CH_3COO , a key intermediate in AD pathways, into H_2 and CO_2 , which can then be used by HM to produce CH_4 ; (ii) substrate availability, even when acetoclastic methanogenesis is inhibited, and CH_3COO can still be present as a substrate in the environment due to the breakdown of complex OM by other microbial activities; (iii) redox balance, in environments where acetoclastic methanogenesis is inhibited and the SAO-HM process helps maintaining

redox balance by facilitating the conversion of CH_3COO to CH_4 and; (iv) flexibility and adaptability, when the SAO-HM process offers flexibility and adaptability for changing environmental conditions. When acetoclastic methanogenesis is inhibited, MO capable of SAO and HM can thrive and replace acetoclastic methanogens in driving CH_4 production. This process is particularly important in environments with high CH_3COO concentrations, as it prevents its accumulation, which can inhibit microbial activity

and disrupt AD processes (Amin et al. 2021). The SAO-HM process provides an alternative pathway for utilizing acetate as an energy source for methane production, ensuring that this valuable substrate is not wasted (Yadav et al. 2022).

The shift in metabolic route could be related to the increase in *Firmicutes*, especially the genus *Clostridia*, that contains acetate-oxidizing bacteria who convert acetate to H₂. Full-scale anaerobic digestion bioreactors showed positive correlations between populations of hydrogenotrophic methanogens and *Clostridia* (Zhang et al. 2019). Ruiz-Sánchez et al. (2019) also reported an increase predominance of syntrophic bacteria, such as *Clostridium* and *Bacteroides*, and alternation of acetoclastic to hydrogenotrophic pathway during AD.

Pan et al. (2021) observed that H₂-consuming methanogens help to maintain balanced biomass and stabilize pH. Both H₂ producers (acetogens) and H₂ consumers (methanogens) can only be favoured at a narrow range of H₂ concentration. H₂ is the most important product in determining the free energy of the reaction because more H₂ is produced stoichiometrically than other products. Several studies have found that inoculum dominated by H₂-utilizing methanogens exhibited a higher methane production rate than *Methanosaeta*, and others acetoclastic methanogens (Gao et al. 2022; Qi et al. 2022). Zhou et al. (2023) found that bacteria and archaea exhibit potential competitiveness (between syntrophic acetate-oxidizing bacteria and acetoclastic archaea) and syntrophic (between hydrogen-producing bacteria and hydrogenotrophic archaea) relationships.

Future research on biogas-producing microbial communities will certainly help enhancing AD efficiency and stability. Standardized methods and analyses are essential for generating data that can be compared and utilized for the development and enhancement of anaerobic digestion models.

In summary, the results obtained in the present study offer valuable insight into the microbial dynamics during sewage sludge AD and highlight the importance of considering the microbial community if the purpose is optimizing the process to maximize biogas production and minimize environmental impacts. Future research efforts may focus on exploring interactions between different microbial groups and identifying strategies to enhance the efficiency of AD in municipal wastewater treatment facilities.

Conclusions

BMP assays having SWS as feedstock showed a bacterial diversity consistent with the profile expected in an AD process. *Firmicutes* was the dominant Phylum during AD followed by *Synergistota*. *Sporanaerobacter* and *Clostridium* were the dominant genera in the BMP reactors. The shift of methanogenic archaeal community from *Methanosaeta* to *Methanobacterium* might be related to the increase of *Firmicutes* and *Synergistota* Phylum in the reactors, affecting the degree of substrate fermentation, that contains acetate-oxidizing bacteria who convert acetate to hydrogen that is scavenged by methanogens, making the reaction thermodynamically possible for these groups. The microbial profiles observed in the present study expand the current knowledge regarding possible syntrophic relationships between hydrogen-producing bacteria and hydrogenotrophic methanogenic archaea in sewage sludge from WWTP. The results obtained help to foresee new horizons for future microbial ecology studies and improvement of biogas production from sewage sludge.

Acknowledgements We are thankful to the State Company of Water and Wastewater (CEDAE), for their help in collecting wastewater.

Author contributions Conceptualization: MER, LT, MM, NM; Writing: MER, LT; Images and tables: MER, LT; Material and Methods: MER, LT; Discussion: MER, LT, MM; Conclusions: MER, LT, MM, NM and Revision: MER, LT, MM, NM.

Funding This research was supported by the Department of Innovation of the Rio de Janeiro State University (UERJ). The financial support from the Carlos Chagas Filho Foundation for Supporting Research in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Proc. 308335/2017-1), Finep (01.19.0087.00) and Capes are also acknowledged.

Data availability This is not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Ethical approval This is not applicable.

Consent to participate All the authors consent to participate in this study.

Consent to publish All the authors consent to publish in this study.

References

- Abendroth C, Vilanova C, Günther T et al (2015) Eubacteria and archaea communities in seven mesophile anaerobic digester plants in Germany. *Biotechnol Biofuels* 8:87
- Al Ali AA, Naddeo V, Hasan SW et al (2020) Correlation between bacterial community structure and performance efficiency of a full-scale wastewater treatment plant. *J Water Process Eng* 37:101472
- Alves IRFS, Mahler CF, Oliveira LB et al (2020) Assessing the use of crude glycerol from biodiesel production as an alternative to boost methane generation by anaerobic co-digestion of sewage sludge. *Biomass Bioenergy* 143:105831
- Amin FR, Khalid H, El-Mashad HM et al (2021) Functions of bacteria and archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production. *Sci Total Environ* 763:143007
- Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D et al (2009) Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci Technol* 59:927–934
- Angelidaki I, Treu L, Tsapekos P et al (2018) Biogas upgrading and utilization: current status and perspectives. *Biotechnol Advances* 36:452–466
- APHA (American Public Health Association) (2017) Standard Methods for Evaluation of Water and Wastewater, 23rd edn. American Water Works Association, Washington, DC
- Arelli V, Mamindlapelli NK, Begum S et al (2021) Solid state anaerobic digestion of food waste and sewage sludge: impact of mixing ratios and temperature on microbial diversity, reactor stability and methane yield. *Sci Total Environ* 793:148586
- Cai M, Wilkins D, Chen J et al (2016) Metagenomic reconstruction of key anaerobic digestion pathways in municipal sludge and industrial wastewater biogas-producing systems. *Front Microbiol* 7:1664–2302
- Cai C, Zhang X, Wu M et al (2021) Roles and opportunities for microbial anaerobic oxidation of methane in natural and engineered systems. *Energy Environ Sci* 14:4803–4830
- Cai Y, Zheng Z, Wei L et al (2022) The characteristics of multi-substrates (low and high C/N) anaerobic digestion: focus on energy recovery and the succession of methanogenic pathway. *Bioresour Technol* 343:125976
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ et al (2016) DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nature methods* 13:581–583
- Campanaro S, Treu L, Panagiotis G et al (2018) Metagenomic binning reveals the functional roles of core abundant microorganisms in twelve full-scale biogas plants. *Water Res* 140:123–134
- Campanaro S, Treu L, Rodriguez-R LM et al (2020) New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters. *Biotechnol Biofuels* 13:25
- Conklin A, Stensel HD, Ferguson J (2006) Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environ Res* 78:486–496
- Di Giacomo G, Romano P (2022) Evolution and prospects in managing sewage sludge resulting from municipal wastewater purification. *Energies* 15:5633
- Díaz C, Baena S, Fardeau ML, Patel BKC (2007) *Aminiphilus circumscriptus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1914–1918
- Dyksma S, Gallert C (2022) Effect of magnetite addition on transcriptional profiles of syntrophic Bacteria and Archaea during anaerobic digestion of propionate in wastewater sludge. *Environ Microbiol Rep* 14:664–678
- Feng J, Burke IT, Chen X et al (2023) Assessing metal contamination and speciation in sewage sludge: implications for soil application and environmental risk. *Rev Environ Sci Biotechnol* 22:1037–1058
- Ferrentino R, Langone M, Fiori L, Andreottola G (2023) Full-scale sewage sludge reduction technologies: a review with a focus on energy consumption. *Water* 15:615
- Fu J, Yan B, Gui S, Fu Y, Xia S (2023) Anaerobic co-digestion of thermo-alkaline pretreated microalgae and sewage sludge: methane potential and microbial community. *J Environ Sci* 127:133–142
- Gao N, Zhang H, Xu X, Teng J (2022) Mutual effects of CO₂ absorption and H₂-mediated electromethanogenesis triggering efficient biogas upgrading. *Sci Total Environ* 818:151732
- García-Peña E, Parameswaran P, Kang D et al (2011) Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: process and microbial ecology. *Bioresour Technol* 102:9447–9455
- Garlicka A, Umiejewska K, Nielsen PH, Muszyński A (2023) Hydrodynamic disintegration of thickened excess sludge and maize silage to intensify methane production: Energy effect and impact on microbial communities. *Bioresour Technol* 376:128829
- Goux X, Calusinska M, Lemaigre S et al (2015) Microbial community dynamics 524 in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnol Biofuels* 8:122
- Gu J, Liu R, Cheng Y, Stanisavljevic N, Li L, Djatkov D, Peng X, Wang X (2020) Anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge under mesophilic and thermophilic conditions: Focusing on synergistic effects on methane production. *Bioresour Technol* 301:122765
- Guo W, Li D, Zhang Z et al (2023) A novel approach for the fractionation of organic components and microbial degraders in ADMI and model validation based on the methanogenic potential. *Water Res* 236:119945
- Hafner SD, Fruteau de Lacroix H, Koch K et al (2020) Improving inter-laboratory reproducibility in measurement of biochemical methane potential (BMP). *Water* 12:1752
- Hernandez-Eugenio G, Fardeau ML, Cayol JL et al (2002) *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel

- acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1217–1223
- Holliger C, Astals S, de Lacroix HF et al (2021) Towards a standardization of biomethane potential tests: a commentary. *Water Sci Technol* 83:247–250
- Jiang Y, McAdam E, Zhang Y et al (2019a) Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: a critical review. *J Water Process Eng* 32:100899
- Jiang J, Wang Y, Liu J et al (2019b) Exploring the mechanisms of organic matter degradation and methane emission during sewage sludge composting with added vesuvianite: Insights into the prediction of microbial metabolic function and enzymatic activity. *Bioresour Technol* 286:121397
- Jiang X, Xie Y, Liu M (2022) Study on anaerobic co-digestion of municipal sewage sludge and fruit and vegetable wastes: methane production, microbial community and three-dimension fluorescence excitation-emission matrix analysis. *Bioresour Technol* 347:126748
- Kampmann K, Ratering S, Kramer I et al (2012) Unexpected stability of bacteroidetes and firmicutes communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Microb Ecol* 78:7
- Kashi S, Satari B, Lundin M et al (2017) Application of a mixture design to identify the effects of substrates ratios and interactions on anaerobic co-digestion of municipal sludge, grease trap waste, and meat processing waste. *J Environ Chem Eng* 5:6156–6164
- Krohn C, Khudur L, Dias DA et al (2022) The role of microbial ecology in improving the performance of anaerobic digestion of sewage sludge. *Front Microbiol* 13:1079136
- Lavergne C, Jeison D, Ortega V, Chamy R, Donoso-Bravo A (2018) A need for a standardization in anaerobic digestion experiments? Let's get some insight from meta-analysis and multivariate analysis. *J Environ Manag* 222:141–147
- Li M, Ge Song G, Liu R, Huang X, Liu H (2022) Inactivation and risk control of pathogenic microorganisms in municipal sludge treatment: a review. *Front Environ Sci Eng* 16(6):70
- Liew CS, Yunus NM, Chidi BS et al (2022) A review on recent disposal of hazardous sewage sludge via anaerobic digestion and novel composting. *J Hazard Mater* 423:126995
- Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Petito V, Gasbarrini A (2013) Commensal clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog* 5:23
- Lv Z, Pan X, Ye ZL et al (2023) Homoacetogenesis is altering the metabolic pathway of acidogenic microbiome and combating volatile fatty acid accumulation in anaerobic reactors. *J Environ Chem Eng* 11(4):110224
- Maragkaki AE, Fountoulakis M, Kyriakou A et al (2018) Boosting biogas production from sewage sludge by adding small amount of agro-industrial by-products and food waste residues. *Waste Manage* 71:605–611
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) Phyloseq: an r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217
- Meyer DD, de Andrade PA, Durrer A et al (2016) Bacterial communities involved in sulfur transformations in wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:10125–10135
- Mommer L, Aronson HS, Amend JP (2018) Genomic description of 'candidatus abyssubacteria', a novel subsurface lineage within the candidate phylum hydrogenedentes. *Front Microbiol* 9:1993
- Nascimento AL, Souza AJ, Andrade PAM et al (2018) Sewage sludge microbial structures and relations to their sources, treatments, and chemical attributes. *Front Microbiol* 9:1664–2302
- Nguyen LN, Kumar J, Minh TV et al (2021) Biomethane production from anaerobic co-digestion at wastewater treatment plants: a critical review on development and innovations in biogas upgrading techniques. *Sci Total Environ* 765:142753
- Nobu MK, Narihiro T, Rinke C et al (2015) Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME J* 9(8):1710–1722
- Pan X, Angelidaki I, Alvarado-Morales M et al (2016) Methane production from formate, acetate and H₂/CO₂; focusing on kinetics and microbial characterization. *Bioresour Technol* 218:796–806
- Pan Y, Zhi Z, Zhen G et al (2019) Synergistic effect and biodegradation kinetics of sewage sludge and food waste mesophilic anaerobic co-digestion and the underlying stimulation mechanisms. *Fuel* 253:40–49
- Pan X, Zhao L, Li C (2021) Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. *Water Res* 190:116774
- Park M, Kim N, Jung S et al (2021) Optimization and comparison of methane production and residual characteristics in mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge by hydrothermal treatment. *Chemosphere* 264:128516
- Qi X, Jia X, Wang Y (2022) Development of a rapid startup method of direct electron transfer-dominant methanogenic microbial electrosynthesis. *Bioresour Technol* 358:127385
- Qin S, Wainaina S, Liu H (2021) Microbial dynamics during anaerobic digestion of sewage sludge combined with food waste at high organic loading rates in immersed membrane bioreactors. *Fuel* 303:121276
- Raposo F, De La Rubia MA, Fernández-Cegrí V, Borja R (2011) Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: an overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renew Sustain Energy Rev* 16:861–877
- Rocha ME, Lazarino TC, Oliveira G, Teixeira L, Marques M, Mangiavacchi N (2024) Analysis of biogas production from sewage sludge combining BMP experimental assays and the ADM1 model. *PeerJ* 12:e16720
- Ruiz-Sánchez J, Guivernau M, Fernández B et al (2019) Functional biodiversity and plasticity of methanogenic biomass from a full-scale mesophilic anaerobic digester treating nitrogen-rich agricultural wastes. *Sci Total Environ* 649:760–769
- Saha S, Basak B, Hwang J-H et al (2020) Microbial symbiosis: a network towards biomethanation. *Trends Microbiol* 28:12
- Schneider D, Zühlke D, Poehlein A et al (2021) Metagenome-assembled genome sequences from different wastewater treatment stages in germany. *Microbiol Resour Announc* 10:e00504-e521

- Serna-García R, Borrás L, Bouzas A et al (2020) Insights into the biological process performance and microbial diversity during thermophilic microalgae co-digestion in an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR). *Algal Res* 50:101981
- Tao B, Zhang Y, Heaven S, Banks CJ (2020a) Predicting pH rise as a control measure for integration of CO₂ biometanisation with anaerobic digestion. *Appl Energy* 277:115535
- Tao Y, Ersahin ME, Ghasimi DSM et al (2020b) Biogas productivity of anaerobic digestion process is governed by a core bacterial microbiota. *Chem Eng J* 380:122425
- Treu L, Kougias PG, Diego-Díaz B et al (2018) Two-year microbial adaptation during hydrogen-mediated biogas upgrading process in a serial reactor configuration. *Bioresour Technol* 264:140–147
- VDI 4630. (2016) Fermentation of organic materials - Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. Germany
- Walter A, Probst M, Franke-Whittle IH et al (2019) Microbiota in anaerobic digestion of sewage sludge with an without co-substrates. *Water Environ J* 33:214–222
- Wang Z, Wang S, Hu Y et al (2022) Distinguishing responses of acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens to ammonia stress in mesophilic mixed cultures. *Water Res* 224:119029
- Xie S, Li X, Wang C et al (2020) Enhanced anaerobic digestion of primary sludge with additives: performance and mechanisms. *Bioresour Technol* 316:123970
- Yadav M, Joshi C, Paritosh K et al (2022) Organic waste conversion through anaerobic digestion: a critical insight into the metabolic pathways and microbial interactions. *Metab Eng* 69:323–337
- Yang Y, Yu K, Xia Y et al (2014) Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5709–5718
- Yang Z, Xu R, Zheng Y et al (2016) Characterization of extracellular polymeric substances and microbial diversity in anaerobic co-digestion reactor treated sewage sludge with fat, oil, grease. *Bioresour Technol* 212:164–173
- Zeng Y, Zheng D, Li LP et al (2024) Metabolism of novel potential syntrophic acetate-oxidizing bacteria in thermophilic methanogenic chemostats. *Appl Environ Microbiol* 90(2):e01090-e1123
- Zhang Z, Zheng H, Sun Y et al (2016) A combined process of chemical precipitation and flocculation for treating phosphating wastewater. *Desalin Water Treat* 57(53):25520–25531
- Zhang W, Zhang F, Li YX (2019) No difference in inhibition among free acids of acetate, propionate and butyrate on hydrogenotrophic methanogen of *Methanobacterium formicicum*. *Bioresour Technol* 294:122237
- Zhang L, Gong X, Wang L et al (2021) Metagenomic insights into the effect of thermal hydrolysis pre-treatment on microbial community of an anaerobic digestion system. *Sci Total Environ* 791:148096
- Zhao X, Li L, Wu D et al (2019) Modified anaerobic digestion model No. 1 for modeling methane production from food waste in batch and semi-continuous anaerobic digestions. *Bioresour Technol* 271:109–117
- Zhou B, Wu W, Li X et al (2023) A state-of-the-art review on anaerobic digestion of sewage sludge based on microbial abundance: correlations among microbiota, performance and process parameters. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 1–24
- Zhu X, Campanaro S, Treu L et al (2020) Metabolic dependencies govern microbial syntrophies during methanogenesis in an anaerobic digestion ecosystem. *Microbiome* 8:22

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.