



SCHIRLEY PAEZ

**ESTUDO DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA E
MICROBIOTA DE LODO PROVENIENTE DE UM REATOR
UASB INSTALADO NA ETE-UFLA TRATANDO ESGOTO
SANITÁRIO**

**LAVRAS - MG
2019**

SCHIRLEY PAEZ

**ESTUDO DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA E MICROBIOTA DE
LODO PROVENIENTE DE UM REATOR UASB INSTALADO NA ETE-UFLA
TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias e Inovações Ambientais da Universidade Federal de Lavras, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias e Inovações Ambientais.

Prof. Dr. Luciene Alves Batista Siniscalchi
Orientadora

Prof. Dr. Mateus Pimentel de Matos
Co-orientador

**LAVRAS - MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Paez, Schirley.

Estudo da Atividade Metanogênica Específica e microbiota de lodo proveniente de um reator UASB instalado na ETE-UFLA tratando esgoto sanitário / Schirley Paez. - 2019.

84 p.

Orientador(a): Luciene Alves Batista Siniscalchi.

Coorientador(a): Mateus Pimentel Matos.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Arqueias metanogênicas. 2. Lodo anaeróbio. 3. Reator UASB. I. Siniscalchi, Luciene Alves Batista. II. Matos, Mateus Pimentel. III. Título.

SCHIRLEY PAEZ

**ESTUDO DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA E MICROBIOTA DE
LODO PROVENIENTE DE UM REATOR UASB INSTALADO NA ETE-UFLA
TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO**

**STUDY OF THE SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY AND MICROBIAL
COMMUNITY OF SLUDGE FROM A UASB REACTOR INSTALLED AT ETE-UFLA
TREATING SANITARY SEWAGE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias e Inovações Ambientais da Universidade Federal de Lavras, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias e Inovações Ambientais.

APROVADA em 16 de dezembro de 2019.

Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi – UFLA

Dr. Mateus Pimentel de Matos – UFLA

Dr. Ronaldo Fia – UFLA

Dra. Érika Ferreira de Abreu Mac Connel – IFBaiano

Prof. Dr. Luciene Alves Batista Siniscalchi
Orientadora

Prof. Dr. Mateus Pimentel de Matos
Co-orientador

**LAVRAS - MG
2019**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias e Inovações Ambientais pela oportunidade de realizar este Mestrado;

À Prof. Luciene pela orientação e incentivo ao longo desse período, e ao Prof. Mateus Matos pelas contribuições;

À minha família, que sempre me guiou e apoiou para que eu pudesse chegar até aqui;

Ao meu noivo Matheus, pelo amor, apoio e o ombro amigo de sempre, e pelas muitas caronas oferecidas pra me ajudar nesse projeto;

Aos professores do Programa pelos conhecimentos repassados, e aos membros da banca de qualificação e de defesa pelas valiosas contribuições com o trabalho;

À turma do TIA pela amizade e companheirismo que tornaram mais leves nossas intensas semanas de aula;

Ao pessoal do laboratório, em especial à Agnes pela ajuda em todas as etapas do projeto e ao Jacineumo pela ajuda indispensável com a montagem dos experimentos de AME;

Aos operadores da ETE, Henrique, Tobias, Aroldo e Aline, pela ajuda e paciência durante as coletas que realizamos;

À Juliana pela atenção e paciência com os meninos que fazem bagunça nos laboratórios, à Lidiane, técnica do CAPQ, e ao Felipe pela ajuda com a cromatografia;

A todos, meu muito obrigada!

RESUMO

A Atividade Metanogênica Específica (AME) consiste na determinação do potencial máximo de geração de metano pela comunidade microbiana selecionada e contida dentro de um sistema. Por meio de um teste de laboratório são fornecidas as condições ótimas, tais como a adição de substrato e o controle de temperatura, a fim de favorecer o metabolismo de arqueias metanogênicas para a produção de metano. Uma vez que permite mensurar a atividade biológica, essa análise pode ser utilizada como parâmetro de monitoramento periódico da atividade do lodo, determinando a massa mínima de lodo a ser mantida no reator para a remoção da carga orgânica aplicada, contribuindo, portanto, para o controle operacional do sistema de tratamento, bem como para obtenção de maior geração de energia na estação de tratamento de esgoto (ETE). Considerando que o efluente tratado na ETE-UFLA apresenta condições distintas das observadas para esgoto sanitário típico, bem como problemas na captação e utilização do biogás produzido na estação, o presente trabalho teve como finalidade avaliar o potencial máximo de geração de metano em lodo anaeróbio de um reator UASB da ETE-UFLA por meio do ensaio de AME com lavagem do biogás em solução alcalina e medição direta do volume de metano. Adicionalmente, avaliou-se também a comunidade microbiana contida no lodo de UASB utilizado para inóculo e após 70 dias de cultivo em meio basal Zinder para enriquecimento de arqueias metanogênicas, com identificação por meio da Plataforma de Sequenciamento de Nova Geração Illumina MiSeq. Obteve-se resultado de AME de 0,055 gDQO_{CH₄}/gSTV.d, valor ao menos duas vezes menor que o usualmente encontrado para lodos anaeróbios tratando esgoto doméstico, sendo observada significativa alteração no resultado no caso de uma perturbação operacional da ETE, demonstrando o potencial deste ensaio como parâmetro de monitoramento de sistemas anaeróbios. Estimou-se ainda que cada reator UASB da ETE teria capacidade de converter 117 kgDQO d⁻¹ em CH₄, produzindo quase 46 m³ d⁻¹ de gás metano. A avaliação da comunidade microbiana mostrou que o lodo de UASB possui abundância de 3,89% de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas do gênero *Methanobacterium*, e apenas 0,12% de *Methanosaeta*, arqueias acetoclásticas. Após o período de cultivo, a abundância de *Methanosaeta* aumentou de 0,12% para 1,37%, indicando que o método empregado foi efetivo no cultivo de arqueias metanogênicas acetoclásticas.

Palavras-chave: Arqueias metanogênicas. Lodo Anaeróbio. Reator UASB.

ABSTRACT

The specific methanogenic activity (SMA) is the determination of the maximum potential of methane production by the microbial community contained within a system. Through a laboratory test, optimum conditions are provided, such as substrate addition and temperature control, in order to favor the metabolism of methanogenic archaeas to produce methane. Since it allows quantification of the biological activity, the test can be used periodically as a monitoring parameter of the sludge activity, determining the minimum sludge mass required to be maintained in the reactor for the removal of the applied organic load, thus contributing with the operational control of the treatment system. Considering that the wastewater treated at UFLA's WWTP shows distinct characteristics if compared with typical sanitary sewage, as well as issues regarding collection and utilization of the generated biogas in the system, the present study aimed to evaluate the maximum potential of methane generation by the anaerobic sludge from a UASB reactor in the wastewater treatment plant of the Federal University of Lavras using the SMA test, through biogas washing in alkaline solution and direct measurement of methane. In addition, the microbial community within the UASB sludge, as well as after 70 days of cultivation in Zinder basal medium for enrichment of methanogenic archaea, was also evaluated, through Illumina MiSeq Next-Generation Sequencing Platform for identification of microorganisms. An SMA value of 0.055 gCOD_{CH₄}/gTVS.day was obtained, at least two times lower than the values usually found for anaerobic sludge treating domestic wastewater, while a significant change in the result was observed in the case of an operational disturbance in the STP, demonstrating the potential of this test as a monitoring parameter in anaerobic systems. It was further estimated that each UASB reactor in the STP would be able to convert 117 kgCOD day⁻¹ to CH₄, producing almost 46 m³ day⁻¹ of methane. The evaluation of the microbial community showed that the UASB sludge 3.89% in abundance of the hydrogenotrophic methanogen *Methanobacterium*, and only 0.12% of the acetoclastic *Methanosaeta*. After cultivation, *Methanosaeta* increased in abundance from 0.12% to 1.37%, indicating that the method was effective for cultivating acetoclastic methanogenic archaea.

Keywords: Anaerobic Sludge. Methanogenic Archaeas. Specific Methanogenic Activity. UASB Reactor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 – Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.
- Figura 3.2 – Determinação gráfica da taxa máxima de produção de metano.
- Figura 4.1 – Esquema das etapas de tratamento da ETE-UFLA
- Figura 4.2 – Desenho esquemático dos reatores UASB instalados na ETE-UFLA.
- Figura 4.3 – Esquema do S1 para determinação da AME com lavagem do biogás.
- Figura 4.4 – Esquema do S2 para determinação da AME com lavagem do biogás.
- Figura 4.5 – Produção acumulada de metano dos ensaios de AME para: a) Ensaio 1 (S1); b) Ensaio 2 (S2); c) Ensaio 3 (S2); d) Ensaio 4 (S2).
- Figure 5.1 – Scheme of the design of the UASB reactors installed at ETE-UFLA.
- Figure 5.2 – Reactor setting for anaerobic biomass enrichment.
- Figure 5.3 – Microbial community composition in inoculum and enriched sludge after 70 days in terms of phylum.
- Figure 5.4 – Heatmap for all the phyla identified before and after cultivation.
- Figure 5.5 – Microbial community composition in inoculum and enriched sludge after 70 days in terms of order.
- Figure 5.6 – Microbial community composition in inoculum and enriched sludge after 70 days in terms of genus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Características típicas de esgoto doméstico bruto.

Tabela 3.2 – Comparação energética de reações comuns na degradação anaeróbia.

Tabela 3.3 – Vias metabólicas da metanogênese e arqueias associadas.

Tabela 3.4 – Classificação das arqueias metanogênicas conhecidas.

Tabela 3.5 – Revisão da literatura quanto à ensaios de AME.

Tabela 4.1 – Concentrações das substâncias utilizadas no preparo da solução-estoque de micronutrientes.

Tabela 4.2 – Concentrações das substâncias utilizadas no preparo da solução-estoque de macronutrientes.

Tabela 4.3 – Levantamento de ST e STV para cada reator UASB da ETE-UFLA.

Tabela 4.4 – Resultados de atividade metanogênica específica (AME) obtidos.

Tabela 4.5 – Resultados de atividade metanogênica específica (AME) obtidos por análise do biogás

Table 5.1 – Zinder basal medium composition.

Table 5.2 – Metal-trace solution composition.

Table 5.3 – Total solids and total volatile solids analysis for each UASB reactor.

Table 5.4 Comparison between diversity indices for the inoculum and the enriched sludge.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AME	Atividade Metanogênica Específica
ANME	<i>Anaerobic Methanotrophic Archaea</i> ou Arquéias Anaeróbias Metanotróficas
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de Carbono
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> ou Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FBAS	Filtros Biológicos Aerados Submersos
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i> ou Hibridação in situ Fluorescente
g	Gramas
Gt	Gigatonelada
H ₂	Hidrogênio
He	Hélio
kg	Quilograma
kWh	Quilowatt-hora
L	Litro
m ³	Metro cúbico
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N ₂	Nitrogênio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> ou Sequenciamento de Nova Geração

OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SO ₄ ²⁻	Sulfato
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> ou Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

PARTE 1	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Tratamento de Esgoto Sanitário	16
3.2 Digestão Anaeróbia	18
3.2.1 Fases da digestão anaeróbia e comunidade microbiana envolvida.....	20
3.2.2 Arqueias metanogênicas	25
3.3 Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e Manda de Lodo (UASB)	29
3.3.1 Aplicabilidade do reator UASB	30
3.4 O Metano	31
3.5 Tecnologias dependentes e independentes de cultivo para a identificação de microrganismos metanogênicos	33
3.6 Atividade Metanogênica Específica	35
REFERÊNCIAS	41
PARTE 2	45
4 ARTIGO 1: ANÁLISE DA ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA DE LODO DE REATOR UASB TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO	46
RESUMO	46
ABSTRACT	46
4.1 Introdução	47
4.2 Material e Métodos	48
4.2.1 Caracterização da área de estudo	48
4.2.2 Caracterização da biomassa presente nos reatores UASB.....	50
4.2.3 Atividade Metanogênica Específica	51
4.2.3.1 Medição direta do volume de metano.....	53
4.2.3.2 Medição do volume e análise da composição do biogás	55
4.3 Resultados e Discussão	56
4.3.1 Caracterização da biomassa presente nos reatores UASB.....	56
4.3.2 Atividade Metanogênica Específica por medição direta do volume de metano	57

4.3.3 Atividade Metanogênica Específica por medição do volume e análise da composição do biogás em Cromatografia Gasosa	61
4.4 Conclusão.....	62
Referências.....	63
5 ARTIGO 2: ENRICHMENT OF METHANOGENIC MICRORGANISMS FROM SLUDGE OF A SEWAGE TREATMENT PLANT.....	66
ABSTRACT.....	66
5.1 Introduction.....	66
5.2 Material and Methods	68
5.2.1 Sewage treatment plant, sampling and selection of the UASB reactor for the study	68
5.2.2 Reactor setting for biomass cultivation.....	68
5.2.3 Reactor operation and monitoring	70
5.2.4 Enriched sludge sampling and analysis	71
5.3 Results and Discussion.....	71
5.3.1 Preliminary analysis and selection of the UASB reactor for the study.....	71
5.3.2 Reactor monitoring	72
5.3.3 Biomass analysis.....	72
5.3.3.1 Phylum	73
5.3.3.2 Order	74
5.3.3.3 Genus	75
5.3.4 Archaea domain	77
5.3.5 Bacteria domain	78
5.4 Conclusion	81
References.....	82
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85

PARTE 1

- 1 INTRODUÇÃO
- 2 OBJETIVOS
- 3 REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O lançamento de efluentes domésticos e industriais, não tratados ou com baixa eficiência de tratamento, em corpos d'água receptores, pode ocasionar uma série de impactos ambientais negativos, tais como a contaminação por microrganismos e seus metabólitos, substâncias recalcitrantes, eutrofização artificial, deteriorando corpos d'água receptores e inviabilizando sua utilização para os mais diversos fins. De acordo com estudos mais recentes, apenas 52,4% da população brasileira têm acesso à coleta de esgoto, e somente 46% dos efluentes domésticos gerados no país são tratados (BRASIL, 2019).

Uma das formas mais utilizadas de tratar efluentes é por meio da digestão anaeróbia, um processo por meio do qual um grupo de microrganismos, em ambiente livre de oxigênio, realiza a conversão de compostos orgânicos complexos em produtos mais simples, em especial metano e gás carbônico (TABATABAEI et al., 2010). A digestão anaeróbia tem recebido crescente atenção nos últimos anos pelo fato de reduzir a poluição ambiental enquanto produz biogás – uma fonte de energia renovável com elevado potencial energético –, remover organismos patogênicos e reduzir os problemas relacionados à disposição de resíduos orgânicos (VELUCHAMY; KALAMDHAD, 2017).

O potencial máximo de geração de metano de determinada biomassa em um reator anaeróbio pode ser obtido pela Atividade Metanogênica Específica (AME), um teste de laboratório que fornece as condições ótimas para conversão de matéria orgânica em gás metano. A AME pode ser utilizada como parâmetro de monitoramento em reatores anaeróbios para avaliação da atividade dos microrganismos metanogênicos e como controle operacional desta etapa de tratamento. Neste sentido, é possível estimar a carga máxima a ser aplicada que não provoque um desequilíbrio na comunidade microbiana e, conseqüentemente, possibilite um melhor funcionamento do sistema (AQUINO et al., 2007).

Ademais, conhecer a estrutura da comunidade microbiana envolvida nas principais reações metabólicas da digestão anaeróbia, sua diversidade, riqueza e abundância é fundamental para a compreensão do estado de equilíbrio entre os microrganismos, do potencial e das limitações das reações, além de servir como alerta acerca de processos inibitórios que possam comprometer as etapas do tratamento anaeróbio (ANTWI et al., 2017). Uma interação equilibrada entre os microrganismos envolvidos nas etapas da degradação anaeróbia é indispensável para que

os intermediários produzidos sejam degradados até formar o gás metano, possibilitando a produção eficiente de biogás. Não obstante, ainda há muito a se conhecer acerca da diversidade e importância dos microrganismos, o que justifica o interesse em expandir os estudos de reatores anaeróbios a fim de buscar maiores informações para subsidiar melhorias no seu desempenho, sobretudo para águas residuárias diferentes do esgoto sanitário típico.

Diante deste cenário, a UFLA trata os efluentes sanitários gerados na instituição utilizando reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB). O reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), foi desenvolvido por Lettinga e colaboradores em 1970, na Holanda, para tratamento de efluentes industriais, começando a ser utilizado no Brasil na década de 1980, em função das condições climáticas favoráveis, da compactidade e da possibilidade de redução das dimensões dos reatores de tratamento aeróbio, como os lodos ativados, os quais usualmente são utilizados após sistemas anaeróbios, resultando em vantagens econômicas (CAMPOS, 1999; CHERNICHARO, 2007), o que levou à ampla utilização deste sistema em estações de tratamento de esgoto sanitário.

Pelo fato de o efluente gerado na UFLA apresentar características consideravelmente distintas das normalmente observadas em esgoto, e serem observados problemas na captação do biogás produzido, como baixa vazão de gás alimentando os *bags* de armazenamento (MATOS, 2019), o presente trabalho teve como finalidade a avaliação do potencial máximo de geração de metano por digestão anaeróbia em um reator UASB localizado na ETE-UFLA, bem como o estudo da comunidade microbiana envolvida no processo, de forma a corroborar na operação adequada desses sistemas e com vistas ao aproveitamento energético do biogás gerado.

O trabalho está estruturado em duas partes, sendo a Parte 1 composta por introdução, objetivos e referencial teórico, e na Parte 2 encontram-se dois artigos científicos que foram produzidos durante a execução da pesquisa, apresentados da forma que serão submetidos para publicação. Ao final são apresentadas considerações finais do trabalho, englobando os resultados obtidos nos dois artigos, e recomendações para trabalhos futuros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de geração de metano e a diversidade microbiana de lodo proveniente de um reator UASB instalado na Estação de Tratamento de Esgoto da Universidade Federal de Lavras – ETE-UFLA.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaios de Atividade Metanogênica Específica, testando-se diferentes procedimentos metodológicos volumétricos (medição direta do volume de metano e medição do volume e composição do biogás) para lodos anaeróbios (Artigo 1);
- Cultivar e selecionar arqueias metanogênicas a partir de lodo de UASB em reator em escala laboratorial (Artigo 2);
- Avaliar a comunidade microbiana inicialmente contida no lodo e enriquecida após cultivo da comunidade metanogênica por meio de técnica de Sequenciamento de Nova Geração (Artigo 2).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

O lançamento de esgoto bruto no solo ou em corpos hídricos foi empregado por muito tempo, sendo ainda observado em diversos locais. Porém, com o crescimento das populações urbanas, o aumento da carga orgânica disposta no ambiente ultrapassou a capacidade de autodepuração da natureza, resultando na deterioração de solos e ecossistemas aquáticos, surgindo a necessidade de se buscar alternativas de tratamento que reduzam ou eliminem o impacto ambiental causado pelos esgotos sanitários. Alguns efeitos negativos do desenvolvimento e urbanização podem ser atenuados ou até eliminados por meio de um tratamento efetivo de efluentes domésticos e industriais.

Até 2017, somente 52,4% da população brasileira possuía coleta de esgoto, e apenas 46% dos esgotos gerados eram tratados, uma situação preocupante face aos possíveis prejuízos que podem ser causados no ambiente pela disposição de poluentes (BRASIL, 2019).

Os esgotos sanitários são compostos majoritariamente por água (99,9%), que contém sólidos suspensos, compostos orgânicos, nutrientes, metais, sólidos dissolvidos inorgânicos, organismos patogênicos, contaminantes tóxicos em caso de despejo de efluentes industriais, entre outros compostos. A esses 0,1% de material em massa é que se deve a necessidade de tratamento do esgoto (CAMPOS, 1999; VON SPERLING, 2005).

3.1 Tratamento de Esgoto Sanitário

Uma estação de tratamento de esgoto consiste na otimização dos processos naturais de degradação de poluentes pelos organismos na natureza, por meio do fornecimento de condições ótimas para a atividade dos microrganismos que atuam na decomposição da matéria orgânica, a fim de se alcançar a melhor eficiência possível em menor tempo de detenção hidráulica (TDH), reduzindo custos em relação a tempo e espaço. O tratamento de esgotos sanitários pode ocorrer em nível preliminar, primário, secundário e terciário. Os tratamentos preliminar e primário incluem processos físicos para remoção de sólidos grosseiros e sedimentáveis, como gradeamento, desarenação e decantação, enquanto o secundário envolve processos biológicos, que podem ser aeróbios ou anaeróbios (CAMPOS, 1999; NUVOLARI, 2003). O tratamento terciário tem a finalidade de melhorar a qualidade do efluente do tratamento biológico,

removendo matéria orgânica residual ou substâncias menos afetadas pelo tratamento anaeróbio, como nutrientes, compostos orgânicos reduzidos e organismos patogênicos (KHAN et al., 2011).

As características dos esgotos variam de acordo com a época (estações do ano, dias da semana, etc.), as atividades da população atendida, atividade industrial e condições climáticas (LOPES, 2015). As características típicas observadas em esgoto doméstico estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Características típicas de esgoto doméstico bruto.

Parâmetros	Concentração		
	Baixa	Média	Alta
DBO (mg L ⁻¹)	110	190	350
DQO (mg L ⁻¹)	250	430	800
NA (mg L ⁻¹)	12	25	45
N-org (mg L ⁻¹)	8	15	25
ST (mg L ⁻¹)	390	720	1230
STF (mg L ⁻¹)	160	300	520
STV (mg L ⁻¹)	110	200	340
S. Sed. (mL.(L.h) ⁻¹)	5	10	20
PT (mg L ⁻¹)	4	7	12
OG (mg L ⁻¹)	50	90	100

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO: Demanda Química de Oxigênio; NA = Nitrogênio Amoniacal; N-org: Nitrogênio orgânico; ST = Sólidos Totais; STF = Sólidos Totais Fixos; STV = Sólidos Totais Voláteis; S. Sed.: Sólidos Sedimentáveis; PT = Fósforo Total; OG = Óleos e Graxas.

Fonte: Metcalf; Eddy (2003).

Devido à baixa eficiência de remoção de matéria orgânica de sistemas biológicos anaeróbios convencionais, por muito tempo o estudo e implementação de sistemas aeróbios obtiveram maior atenção, pois apresentam boa eficiência de tratamento e não requerem grandes áreas. Porém, comumente apresentam alto custo energético, produzem grande quantidade de lodo não estabilizado, e demandam alto investimento de instalação, operação e manutenção. Com o surgimento dos sistemas anaeróbios de alta taxa, como o reator UASB e os filtros anaeróbios, que promovem elevado contato entre o efluente e os microrganismos, possibilitando maior remoção de matéria orgânica em menor tempo de detenção hidráulica, as estratégias de tratamento retornaram para os processos anaeróbios. Estes sistemas apresentam baixo custo, possibilidade de recuperação de energia na forma de biogás, baixo consumo energético e baixa produção de lodo, o qual já está estabilizado (KHAN et al., 2011).

Como evidenciado por Seghezzo et al. (1998), sistemas de tratamento de esgoto adequados precisam ser simples em design e eficientes em remoção de poluentes, com baixo

consumo de energia, devem maximizar reuso de água e recuperação de produtos, além de demandar baixa mecanização e sofisticação, requisitos essenciais para viabilidade de aplicação tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, onde custos de investimento e consumo energético precisam ser reduzidos e eficiência de tratamento precisa ser otimizada.

Neste contexto, a digestão anaeróbia, parte importante do tratamento secundário, é foco deste trabalho e será discutida no tópico a seguir.

3.2 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia é o processo de conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico e outros compostos em menor quantidade, como água, gás sulfídrico e amônia, em ambiente livre de oxigênio molecular, por meio de processos metabólicos complexos em etapas sequenciais, produzindo novas células bacterianas. A digestão depende principalmente de três grupos de microrganismos: bactérias fermentativas (acidogênicas), bactérias sintróficas (acetogênicas) e arqueias metanogênicas. A formação de metano ocorre preferencialmente onde, além da ausência de oxigênio, nitrato e sulfato também não estejam disponíveis como aceptores de elétrons (CHERNICHARO, 2007; TABATABAEI et al., 2010).

A digestão anaeróbia tem sido aplicada para tratamento de resíduos sólidos, dejetos animais, efluente de indústrias agrícolas e alimentícias, bem como para esgotos sanitários, com considerações em relação à temperatura de operação, sendo um processo mais atrativo para países em regiões de clima tropical e subtropical (CHERNICHARO, 2007). O tratamento anaeróbio de efluentes apresenta diversas vantagens, entre elas a geração de uma fonte de energia (o biogás), não requer energia para aeração, e menor custo para manejo do lodo (BANDARA et al., 2012).

Em sistemas anaeróbios, é desejável que se obtenha o máximo de conversão de matéria orgânica em metano possível, não só pela possibilidade de utilização energética do gás, mas porque a matéria orgânica (em DQO) é removida efetivamente da fase líquida ao ser convertida para metano, que apresenta baixa solubilidade e se desprende do líquido, promovendo eficiência na remoção da carga orgânica do sistema, embora uma pequena parcela do metano possa permanecer como metano dissolvido no efluente (SOUZA, 2010).

O aumento da utilização e aceitação dos sistemas de digestão anaeróbia nos últimos anos

se deve à verificação de que aproximadamente 70% da matéria orgânica das águas residuárias é removida sem a necessidade de gasto energético ou adição de substâncias químicas para o seu funcionamento. Além disso, a melhor compreensão do processo como um todo, resultado dos estudos e pesquisas na área, permitiu o desenvolvimento de sistemas mais eficientes que os sistemas clássicos (CAMPOS, 1999). Sistemas anaeróbios de alta taxa, como os reatores UASB, combinados com um sistema de pós-tratamento, consistem em uma alternativa sustentável para o tratamento de águas residuárias, pois reduzem o gasto energético em relação a sistemas puramente aeróbios (KHAN et al., 2011).

Alguns fatores ambientais afetam a digestão anaeróbia e precisam ser monitorados a fim de se obter uma remoção satisfatória de matéria orgânica. A temperatura de operação, por exemplo, afeta intensamente a atividade e crescimento biológicos, sendo observado que abaixo de 20°C já ocorre redução da degradação. O tratamento anaeróbio de águas residuárias pouco concentradas, como os esgotos sanitários, em temperatura ambiente ou baixas temperaturas já tem sido demonstrado com sucesso, porém a taxa de remoção de DQO e de produção de metano são mais baixas devido a menor atividade microbiana sob condições psicrófilas. Além disso, em baixas temperaturas, a solubilidade do CH₄ em água aumenta, podendo levar a maiores perdas de metano dissolvido no efluente (BANDARA et al., 2012).

O pH também apresenta forte influência sobre a digestão anaeróbia, devendo ser mantido em valores acima de 6,5. Para algumas águas residuárias, a sua própria composição é suficiente para manutenção do pH por meio da alcalinidade, como geralmente ocorre com esgoto sanitário. No entanto, para alguns efluentes industriais, por exemplo, pode ser necessário adicionar um agente de tamponamento para controle do pH do meio (LETTINGA et al., 1984; SEGHEZZO et al., 1998).

Reatores anaeróbios devem manter uma relação alcalinidade/DQO satisfatória, a fim de evitar queda do pH a valores abaixo de 6,2, o que pode levar a falhas no sistema por inibição dos microrganismos metanogênicos. Agdag e Sponza (2005) observaram que a adição de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) para suplementar a alcalinidade de um biodigestor anaeróbio tratando resíduos sólidos orgânicos aumentou significativamente a concentração de metano no biogás produzido, e sua produção acumulada ao longo do experimento, além de manter o pH em valores acima de 7,0. Neste estudo, os autores sugerem uma relação alcalinidade/DQO de 1,3. Recomenda-se que a concentração de alcalinidade esteja na faixa de 1000 a 5000 mg CaCO₃ L⁻¹,

dependendo da concentração de DQO do efluente e da produção de ácidos orgânicos voláteis no sistema.

A compreensão da microbiologia da digestão anaeróbia é fundamental para que as vantagens do tratamento de efluentes por este método sejam obtidas. É necessário conhecer a ecologia e a função das comunidades microbianas envolvidas para propiciar melhor controle dos processos biológicos, já que a eficiência do sistema depende da atuação da biomassa ativa nos reatores (TABATABAEI et al., 2010).

3.2.1 Fases da digestão anaeróbia e comunidade microbiana envolvida

A digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas sequenciais, podendo ocorrer uma quinta fase, cada uma dependente de um grupo de microrganismos específico: hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese e sulfetogênese. Estas etapas estão ilustradas na Figura 3.1.

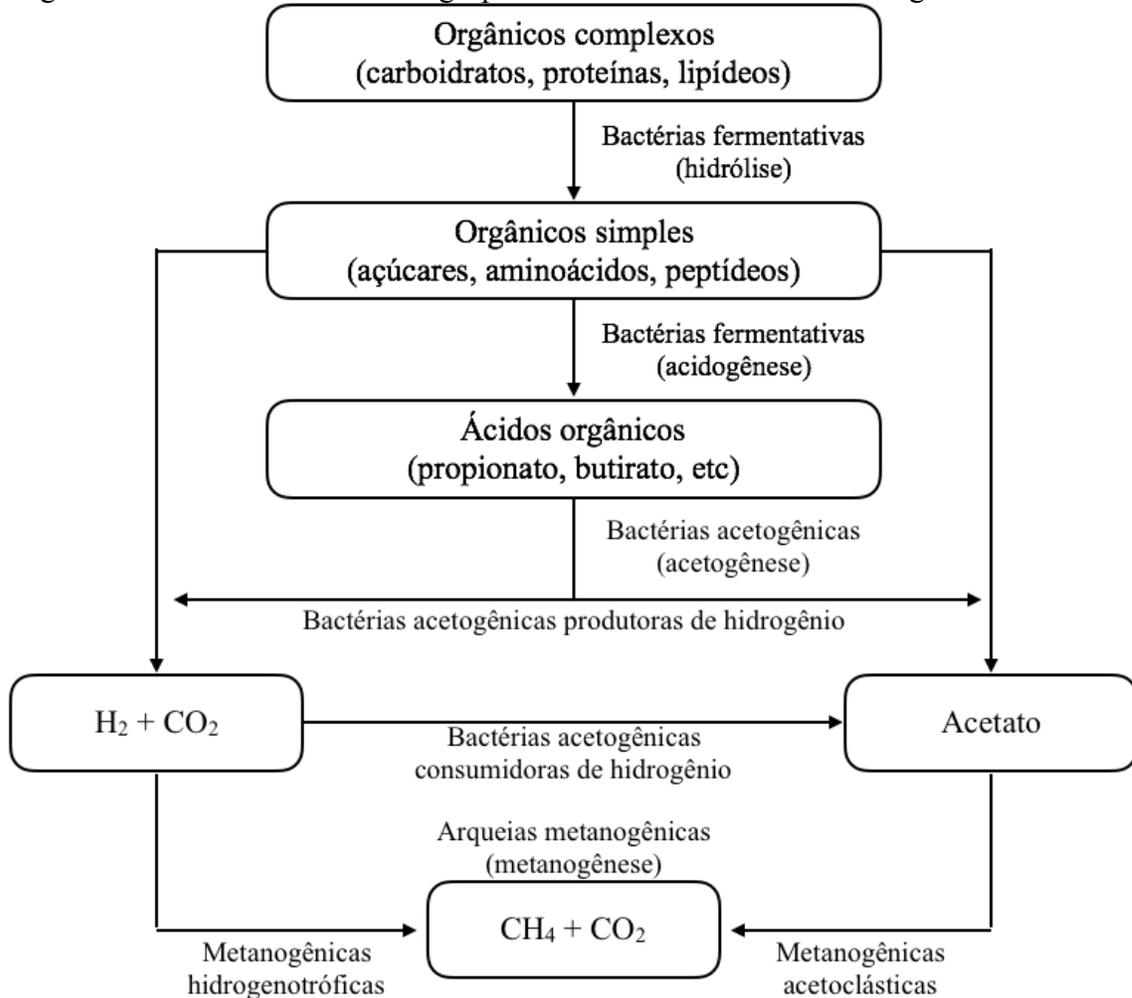
Na primeira fase do processo de degradação anaeróbia ocorre a hidrólise de substâncias particuladas complexas (polímeros), como proteínas, carboidratos e gorduras, em substâncias dissolvidas mais simples, como açúcares e aminoácidos, para que possam ser assimiladas pelas bactérias fermentativas. Essa conversão é realizada por enzimas exógenas excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas (LETTINGA et al., 1984; LECKER et al., 2017).

Os principais gêneros de bactérias que atuam na fase de hidrólise da digestão anaeróbia incluem: *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, que produzem lipases que degradam lipídeos; *Bacteroides*, *Butyvirbio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Peptococcus* e *Bacillus*, que atuam na degradação de proteínas pela produção de proteases; *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Acetivibrio* e *Eubacterium*, que produzem amilases para degradação de polissacarídeos (CHERNICHARO, 2007).

Na acidogênese, as substâncias solúveis, produtos da hidrólise, são metabolizadas pelas bactérias fermentativas, e convertidas principalmente em ácidos orgânicos voláteis, tais como propionato e butirato, além de álcoois, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, amônia e sulfeto de hidrogênio. Por serem os ácidos orgânicos o principal composto produzido pelas bactérias fermentativas, essas são comumente denominadas bactérias fermentativas acidogênicas (LETTINGA et al., 1984; LECKER et al., 2017). O ácido acético é usualmente o intermediário mais abundante em sistemas de digestão anaeróbia, sendo o precursor de cerca de 72% do metano

produzido por lodo de ETEs (CHERNICHARO, 2007).

Figura 3.1 – Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: Chernicharo (2007).

As bactérias fermentativas que atuam na acidogênese podem ser de diversos grupos de microrganismos, sendo os gêneros mais comumente encontrados em reatores anaeróbios: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* (CHERNICHARO, 2007).

As bactérias acetogênicas oxidam os subprodutos da acidogênese, convertendo-os em substratos adequados para a metanogênese. Esses subprodutos são o hidrogênio, o gás carbônico e o acetato (LECKER et al., 2017). De todas as substâncias produzidas pelas bactérias acidogênicas, apenas o hidrogênio e o acetato podem ser utilizados pelas arqueias metanogênicas.

No entanto, nesse ambiente, pelo menos 50% da DQO biodegradável é convertida em propionatos e butiratos, que são posteriormente decompostos em acetato e hidrogênio, pela ação das bactérias acetogênicas. Os gêneros conhecidos de bactérias acetogênicas comumente presentes em reatores anaeróbios são *Syntrophobacter* e *Syntrophomomas* (CHERNICHARO, 2007).

Na metanogênese, etapa final da degradação anaeróbia, ocorre a conversão dos subprodutos da digestão em gás metano e gás carbônico. Esta etapa é realizada pelas arqueias metanogênicas, que utilizam uma variedade de substratos, incluindo o ácido acético, fórmico, hidrogênio e gás carbônico, metanol e metilaminas. Nesse sentido, as arqueias metanogênicas podem ser divididas em dois grupos principais em função da afinidade por determinado substrato e pela produção de metano: as acetoclásticas, que geram metano a partir do acetato; e as hidrogenotróficas, que produzem metano a partir da redução do CO₂ utilizando o H₂ como doador de elétrons (CHERNICHARO, 2007; ABREU, 2007).

Tanto as arqueias metanogênicas acetoclásticas quanto as hidrogenotróficas são importantes no processo de digestão anaeróbia por produzirem metano, que é removido do líquido, e por consumirem o hidrogênio produzido nas fases anteriores da digestão. Até pouco tempo a participação das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas na produção de metano era subestimada, porém estudos demonstraram que, em alguns casos, o acetato é oxidado a CO₂ e H₂, e estes organismos realizam a conversão a metano e água (LECKER et al., 2017).

A digestão anaeróbia ocorre por uma associação sintrófica entre bactérias anaeróbias, leveduras e/ou protozoários anaeróbios, e bactérias sintróficas, acetogênicas e arqueias metanogênicas. Sintrofia consiste em uma situação nutricional na qual dois ou mais organismos combinam suas capacidades metabólicas a fim de catabolizar uma substância que estes não seriam capazes de catabolizar sozinhos. As bactérias anaeróbias, fungos e protozoários hidrolisam polímeros a monômeros e lipídios a glicerol e ácidos graxos de cadeia longa, e juntamente com as bactérias sintróficas, fermentam estes produtos a ácido acético, CO₂ e H₂. As arqueias metanogênicas, por fim, convertem acetato, H₂ e CO₂ a metano (THAUER et al., 2008).

O grau de dependência entre os microrganismos anaeróbios pode variar consideravelmente. Enquanto os organismos metanogênicos dependem dos produtos das fases anteriores da digestão anaeróbia para obtenção de substrato, estes também podem afetar significativamente a atividade das bactérias fermentativas pela remoção de produtos metabólicos.

Isto ocorre com bactérias acetogênicas, cujas reações de degradação dos substratos são endergônicas ($\Delta G > 0$), ou seja, não espontâneas, caso não estejam associadas a um organismo que consuma seus produtos metabólicos, no caso o H_2 , mantendo baixa pressão de hidrogênio e permitindo que a reação ocorra (SCHINK; STAMS, 2006).

Caso a concentração de H_2 no meio aumente, devido a um excesso de substrato fermentável, por exemplo, ou inibição de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas causada por queda do pH ou presença de compostos tóxicos, a reação de acetogênese não ocorre, levando à acumulação de ácidos orgânicos. Isto pode causar redução do pH e inibir ainda mais as metanogênicas, o que leva ao chamado “azedamento” de reatores, cessando por completo a metanogênese e parando a fermentação na acidogênese, marcado pelo acúmulo de grandes quantidades de ácidos graxos que causam mau cheiro, problema encontrado em reatores anaeróbios mal operados (SCHINK; STAMS, 2006).

Tabela 3.2 – Comparação energética de reações comuns na degradação anaeróbia.

Nº	Reação	ΔG_o (kJ reação ⁻¹)
Acidogênese		
1	Glicose → Acetato $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$	-206
2	Glicose → Propionato $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-358
3	Glicose → Butirato $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$	-255
Acetogênese		
4	Bicarbonato → Acetato $2HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-104,6
5	Propionato → Acetato $CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+76,1
6	Propionato → Acetato $CH_3CH_2COO^- + 2HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3HCO_3^-$	+72,2
7	Butirato → Acetato $CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48,1
8	Etanol → Acetato $CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+9,6
9	Lactato → Acetato $CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$	-4,2
Metanogênese e Sulfetogênese		
10	Acetato → Metano $CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31,0
11	Hidrogênio → Metano $H_2 + \frac{1}{4}HCO_3^- + \frac{1}{4}H^+ \rightarrow \frac{1}{4}CH_4 + \frac{3}{4}H_2O$	-33,9
12	Formiato → Metano $HCOO^- + \frac{1}{4}H_2O + \frac{1}{4}H^+ \rightarrow \frac{1}{4}CH_4 + \frac{3}{4}HCO_3^-$	-32,6
13	Bicarbonato → Metano $HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135,6
14	Sulfato → Sulfeto $SO_4^{2-} + 4H_2 + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-151,9
Reação global sintrófica		
15	Propionato → Metano $CH_3CH_2COO^- + 1,75H_2O \rightarrow 1,75CH_4 + 1,25HCO_3^- + 0,25H^+$	-56,6

Fonte: Chernicharo (2007).

A Tabela 3.2 traz algumas reações comuns na degradação anaeróbia comparando a variação de energia livre padrão (em pH = 7, pressão = 1 atm e temperatura = 25°C) de cada etapa. Observa-se que as bactérias acidogênicas são as mais favorecidas energeticamente (reações

1 a 3), enquanto as reações acetogênicas não são termodinamicamente favoráveis (reações 5 a 8), porém estas ocorrem naturalmente em reatores anaeróbios graças à sintrofia com as arqueias metanogênicas. A sintrofia está ilustrada pela reação global (15), que resulta em 56,6 kJ/mol de energia, sendo a reação termodinamicamente favorável, porém resulta em um baixo valor de energia que precisa ser dividido entre os microrganismos acetogênicos, metanogênicos acetoclásticos e metanogênicos hidrogenotróficos, resultando na baixa taxa de crescimento dos mesmos (CHERNICHARO, 2007).

Os microrganismos metanogênicos são os mais restritos em relação às condições do meio, preferindo valores de pH próximos da neutralidade, com uma faixa ótima normalmente entre 6,5 a 8,2. A hidrólise da matéria orgânica nas fases iniciais da digestão anaeróbia resulta na geração de ácidos orgânicos voláteis, sendo essencial a manutenção de um equilíbrio entre a produção e o consumo de ácidos para o funcionamento satisfatório do processo anaeróbio. De acordo com as características do efluente a ser tratado, pode ser necessária a adição de alcalinidade ao meio. Se a concentração de ácidos no meio exceder a alcalinidade disponível, o reator irá “azedar”, inibindo severamente a atividade microbiana, especialmente a metanogênica (AGDAG; SPONZA, 2005).

A metanogênese possui alguns interferentes, além das condições ambientais, como a concentração de certas substâncias. A geração de metano como principal produto da digestão anaeróbia ocorre apenas em ambientes anóxicos com baixas concentrações de sulfato, nitrato, Mn (IV) e Fe (III), já que, por razões termodinâmicas das reações, a metanogênese é desfavorecida pela presença desses aceptores de elétrons (THAUER et al., 2008).

A sulfetogênese é indesejável e nem sempre ocorre, podendo acontecer quando as águas residuárias que contêm compostos de enxofre encontram-se em condições favoráveis à sua produção, pela redução de sulfatos (NUVOLARI, 2003). Esse processo transforma sulfatos e outros compostos à base de enxofre em sulfetos durante a oxidação de compostos orgânicos, e é realizado por bactérias redutoras de sulfato. A sulfetogênese ocorre como rota alternativa à acetogênese e metanogênese, provocando competição por substrato entre os microrganismos envolvidos nestas reações. A intensidade dessa competição depende de vários aspectos, em especial o pH e a relação entre DQO/SO₄²⁻ (demanda química de oxigênio/concentração de sulfatos) (CHERNICHARO, 2007).

Entre as bactérias redutoras de sulfato existem as que oxidam seus substratos até o

acetato, grupo considerado acetoclástico não-fermentativo, como *Desulfobulbus* sp., *Desulfomonas* sp. e a maioria das espécies do gênero *Desulfotomaculum*, e o grupo que oxida seus substratos completamente até gás carbônico, competindo efetivamente com a metanogênese, representado pelos gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* e *Desulfonema* (CHERNICHARO, 2007).

Conhecer a estrutura das comunidades microbianas envolvidas nas quatro reações metabólicas principais da digestão anaeróbia é fundamental para o entendimento do potencial e das limitações dessas reações, além de servir como alerta acerca de processos inibitórios que possam comprometer o processo de digestão anaeróbia. Fatores como temperatura, configuração do biorreator, alterações no pH e no substrato e compostos tóxicos irão alterar a comunidade de microrganismos quanto aos diferentes grupos tróficos, como bactérias fermentativas, sintróficas e metanogênicas, variando inclusive nas diferentes alturas dentro de um mesmo reator UASB (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; ANTWI et al., 2017).

3.2.2 Arqueias metanogênicas

O domínio *Archaea* é composto principalmente por microrganismos extremófilos, que crescem em ambientes normalmente considerados inóspitos para a vida, com condições extremas de temperatura, salinidade e pH. Em se tratando das arqueias metanogênicas, um maior conhecimento da biologia desses organismos, para melhor compreensão das funções exercidas por eles e suas interações com outros componentes da biodiversidade, possibilitam a otimização de processos que incluem o tratamento de esgoto doméstico (CARDOSO et al., 2003).

A separação do domínio *Archaea* do domínio *Bacteria* foi proposta em 1990 baseada na diferença do tipo de RNA ribossômico contido nas células desses organismos e diferenças na parede celular (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). As arqueias possuem papel importante nos ciclos biogeoquímicos, e estão distribuídas em diversos ambientes. Desses microrganismos, pode-se destacar os metanogênicos, sendo que a capacidade de produzir metano como resíduo do metabolismo anaeróbio é uma característica encontrada somente nos organismos deste grupo. As arqueias metanogênicas são naturalmente encontradas em ambientes com ausência de oxigênio e abundância de matéria orgânica, como pântanos, fundo de açudes e lagos, sedimentos marinhos e rúmen de bovinos, além dos processos de tratamento anaeróbio de águas residuárias (CARDOSO

et al., 2003; KURODA et al., 2014).

Tabela 3.3 – Vias metabólicas da metanogênese e arqueias associadas.

Via metabólica	Ordem	Reação	ΔG_0 (kJ mol ⁻¹ de CH ₄)
Acetoclástica	<i>Methanosarcinales</i> (<i>Methanosaeta</i> , <i>Methanosarcina</i>)	$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-31,0
Hidrogenotrófica	<i>Methanosarcinales</i> (<i>Methanosarcina</i>)	$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-135,6
	<i>Methanobacteriales</i>	$4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130,1
	<i>Methanococcales</i>		
	<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanopyrales</i>		
Metilotrófica	<i>Methanosarcinales</i> (<i>Methanosarcina</i>)	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-104,9
		$4\text{CH}_3\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$	-75,9

Fonte: Abreu (2007).

As arqueias hidrogenotróficas são representadas por cinco ordens, sendo que quase todas as espécies realizam a redução de CO₂ a CH₄, utilizando H₂ como principal doador de elétrons. Já as acetoclásticas e metilotróficas são representadas pela ordem *Methanosarcinales*, sendo capazes de gerar CH₄ de uma variedade de compostos metílicos, ou do grupo metil do acetato (COSTA; LEIGH, 2014).

De acordo com diversos estudos, arqueias metanogênicas das classes *Methanomicrobia* e *Methanobacteria* são as principais hidrogenotróficas e acetoclásticas, respectivamente, encontradas em lodos metanogênicos. Os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaetha*, da ordem *Methanosarcinales*, utilizam acetato como substrato, porém *Methanosarcina* tem a capacidade de utilizar também hidrogênio e diversos compostos metílicos (CHERNICHARO, 2007; KURODA et al., 2014).

A Tabela 3.4 traz a classificação de classe, ordem, família e gênero das arqueias metanogênicas conhecidas. Uma descrição específica de cada ordem, família e gênero pode ser encontrada no trabalho de Garcia, Patel e Ollivier (2000).

Arqueias metanogênicas acetoclásticas, apesar de serem poucas espécies, costumam ser os microrganismos predominantes em sistemas de digestão anaeróbia. Todas as espécies que utilizam acetato pertencem à ordem *Methanosarcinales*, na qual a família *Methanosaetaceae* possui taxa máxima de crescimento específico menor, porém tem maior afinidade pelo acetato,

sendo predominante em sistemas com baixa concentração de acetato (menor que 1mM ou 59 mg/L). Já a família *Methanosarcinaceae* possui menor afinidade pelo acetato, porém apresenta maior taxa máxima de crescimento específico, predominando em concentrações de acetato maiores de 1 mM, o que comumente ocorre em sistemas com baixa eficiência ou no período de partida de reatores (CHERNICHARO, 2007).

Tabela 3.4 – Classificação das arqueias metanogênicas conhecidas.

Classe	Ordem	Família	Gênero
<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>
			<i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanosphaera</i> <i>Methanothermobacter</i>
		<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanothermus</i>
<i>Methanococci</i>	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i> <i>Methanothermococcus</i>
		<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i> <i>Methanotorris</i>
		<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>
<i>Methanoculleus</i>			
<i>Methanofollis</i>			
<i>Methanogenium</i>			
<i>Methanolacinia</i> <i>Methanoplanus</i>			
<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanocorpusculaceae</i>	<i>Methanocorpusculum</i>
		<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>
		<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>
			<i>Methanococcoides</i>
			<i>Methanohalobium</i>
<i>Methanohalophilus</i> <i>Methanolobus</i> <i>Methanomethylovorans</i> <i>Methanimicrococcus</i> <i>Methanosalsum</i>			
<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>		

Fonte: Demirel e Scherer (2008).

Bandara et al. (2012) analisaram o tratamento de esgoto doméstico em reator UASB em temperaturas que variaram de 6°C a 31°C, e avaliaram a comunidade de arqueias do lodo anaeróbico, observando que, após a adaptação dos microrganismos às baixas temperaturas, ocorreu redução da diversidade e da abundância relativa de arqueias metanogênicas acetoclásticas, e aumento de metanogênicas hidrogenotróficas, demonstrando que estes organismos possuem papel importante na remoção de DQO no tratamento de esgoto doméstico

em baixas temperaturas. O lodo de inóculo, no início do experimento, apresentou predominância de *Methanosaeta*, metanogênicas acetoclásticas, enquanto no lodo maduro, ao final do experimento, predominaram *Methanolinea tarda* e *Methanobacterium beijingense*, as quais utilizam H₂ e formiato para crescimento e produção de metano.

Kuroda et al. (2014) realizaram experimento comparando lodos anaeróbios de tratamento de diversos efluentes, e reportaram predominância dos gêneros *Methanobacterium*, da ordem *Methanobacteriales*, e *Methanosaeta*, da ordem *Methanosarcinales*, em lodo de reator UASB tratando esgoto doméstico a temperatura ambiente (10°C a 29°C). *Methanobacterium* são metanogênicas hidrogenotróficas com papel importante na degradação final da digestão anaeróbia utilizando H₂ ou formiato, enquanto *Methanosaeta* são metanogênicas acetoclásticas, frequentemente encontradas em lodo metanogênico do tratamento de efluentes industriais e domésticos. Os autores também encontraram, em menor quantidade, os gêneros *Methanospirillum* e *Methanolinea*, da ordem *Methanomicrobiales*, que são metanogênicas hidrogenotróficas.

Zhang et al. (2018) avaliaram a comunidade de um reator UASB em escala piloto tratando esgoto doméstico com temperatura de operação na faixa de 10 a 20°C e observaram predominância de arqueias acetoclásticas *Methanosaetaceae* e hidrogenotróficas *Methanomicrobiales*. Os autores reportaram leve redução de *Methanosaetaceae* com a diminuição da temperatura para 12,5°C e 10°C em comparação com 15 e 20°C, enquanto a abundância de *Methanomicrobiales* aumentou a 10°C.

Díaz et al. (2006) analisaram grânulos anaeróbios de reator UASB tratando efluente de cervejaria por meio de três técnicas distintas, e observaram predominância de arqueias do grupo *Methanosaeta*, sendo que *Methanosaeta concilii* correspondeu a 70% dos clones de arqueias obtidos, além de identificar também a presença de *Methanosarcina mazei* e *Methanospirillum hungatei*, concluindo que metanogênicas acetoclásticas são mais abundantes que metanogênicas hidrogenotróficas. Já digestores tratando dejetos animais costumam apresentar predominância de *Methanosarcina*, o que pode ser atribuído aos altos níveis de amônia livre presentes nesse substrato, que restringe a atividade de *Methanosaeta* (TABATABAEI et al., 2010).

Dentre as ordens de arqueias metanogênicas, destaca-se ainda a capacidade de metanogênese reversa que algumas ordens possuem, tais como *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* e *Methanococcales*, as quais, além de contribuírem para a produção de

metano, são também capazes de consumir o metano gerado no sistema. O grupo é conhecido como Arqueias Anaeróbias Metanotróficas, do inglês *Anaerobic Methanotrophic Archaea* – ANME (KNITTEL; BOETIUS, 2009; SINISCALCHI, 2015).

3.3 Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (UASB)

No tratamento anaeróbio aplicam-se condições favoráveis ou exclusivas ao desenvolvimento de microrganismos adaptados à ausência de oxigênio, em especial bactérias acidogênicas e arqueias metanogênicas, a fim de acelerar o processo de degradação da matéria orgânica. Estas condições abrangem o projeto do reator, que deve manter grande massa de bactérias envolvidas no processo em contato intenso com a matéria orgânica do efluente, bem como condições operacionais, que incluem o pH, a temperatura, a presença de nutrientes e a ausência de compostos tóxicos (VON SPERLING, 2005; LETTINGA et al., 1984).

O reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, UASB (do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), foi desenvolvido por Lettinga e colaboradores na Holanda na década de 1970, com o objetivo de criar um sistema de tratamento anaeróbio para tratar efluentes com alta carga orgânica em tempos de detenção hidráulica reduzidos (3 a 4 horas). Foram adicionados separadores para sólidos e para o gás, a fim de solucionar o problema da perda de biomassa e baixo tempo de retenção do lodo nos digestores que já existiam. Os resultados em testes de bancada com o sistema desenvolvido mostraram que este tinha capacidade de receber cargas orgânicas na faixa de 15 a 40 kg de DQO por m³ de reator por dia, com tempos de detenção hidráulica (TDH) de 3 a 8 horas. Os resultados em escala real mostraram um tratamento satisfatório operando com carga orgânica de 16 kg de DQO por m³ por dia com TDH de 4 horas (LETTINGA et al., 1980).

Diante dos resultados obtidos desde então, tem se observado que os reatores UASB constituem uma alternativa interessante para o tratamento de esgoto, principalmente para países em desenvolvimento e pequenas comunidades, além de que o biogás e o efluente tratado, produtos do tratamento de esgoto doméstico em reatores UASB, podem ser recuperados e reutilizados (KHAN et al., 2011).

O sistema UASB consiste em um reator sem a presença de material suporte para a biomassa, e apresenta um separador trifásico, que permite a separação dos sólidos e gases

gerados do efluente final tratado (LETTINGA et al., 1984; LETTINGA, 1995). Em reatores de alta taxa, como o reator UASB, o tempo de retenção de microrganismos, o lodo, é maior que o tempo de retenção do líquido, o que propicia maior eficiência do processo. No reator UASB, a água residuária a ser tratada é inserida no reator pelo fundo, e segue um fluxo ascendente através da manta de lodo, sendo o efluente tratado coletado na parte superior (TABATABAEI et al., 2010).

A eficiência de tratamento dos reatores UASB está no estabelecimento da manta de lodo no fundo do reator, onde ocorrem os processos biológicos. O contato intenso entre a biomassa e o efluente é possibilitado pela turbulência causada pela entrada de líquido, distribuída de maneira uniforme no fundo do reator, e pela liberação do biogás produzido. Para o tratamento de esgoto doméstico, que é considerado um efluente de baixa carga orgânica, o contato entre a água residuária e o lodo pode se tornar um fator limitante, já que a produção de biogás é menor, necessitando de uma melhor distribuição do fluxo de alimentação do que seria necessário para efluentes industriais, a fim de manter a mistura do lodo (LETTINGA, 1995; SEGHEZZO et al., 1998).

Nos reatores UASB, as comunidades de microrganismos metanogênicos formam grânulos, normalmente com dimensões de 0,2 a 5,0 mm, ou flocos, que apresentam alta densidade e alta atividade metanogênica. Os diferentes tipos fisiológicos de microrganismos ficam muito próximos uns dos outros, melhorando a transferência de elétrons entre as espécies, propiciando a alta taxa de formação de metano (DÍAZ et al., 2006).

3.3.1 Aplicabilidade do reator UASB

A aplicabilidade dos reatores UASB começou a ser discutida com os trabalhos de Lettinga nos anos 1980, que apresentou resultados indicando que, em países de clima quente, seria possível atingir remoção de DQO em torno de 70%. Porém, a eficiência de degradação diminuiu com a redução da temperatura de operação, chegando a valores de eficiência de 50% de remoção de DQO a 15°C (KHAN, 2011).

Sistemas anaeróbios costumam ser mais utilizados no tratamento de efluentes industriais com elevada carga orgânica. Assim, como esgoto sanitário normalmente apresenta menores concentrações de DQO, há produção de metano relativamente baixa, insuficiente para aquecer o

reator, que em muitos locais é necessário para manter condições mesofílicas de temperatura de operação. Por isso, o UASB para tratamento de esgoto doméstico tornou-se mais popular em países tropicais, que possuem menor necessidade de aquecimento, atingindo eficiências de remoção de DQO acima de 70% (LEW et al., 2004).

Uma das grandes vantagens de sistemas de tratamento que utilizam reatores UASB está no fator econômico. A aplicação de um reator UASB seguido de um sistema aeróbio possibilita economia de custos de instalação na faixa de 20 a 50% e de custos operacionais acima de 50% em comparação com sistemas de lodos ativados convencionais (CHERNICHARO et al., 2015).

O reator UASB é visto como uma tecnologia sustentável para tratamento de águas residuárias domésticas, pelo menor gasto com energia para operação do sistema. No entanto, este sistema isoladamente não tem capacidade de tratar os esgotos a níveis que atendam os padrões de lançamento, o que requer a associação a um pós-tratamento. Na Índia, a maioria das ETEs que aplicam UASB possuem unidades de polimento final, como lagoas, após a digestão anaeróbia. No Brasil, normalmente são empregados lodos ativados, filtros aerados submersos ou lagoas de estabilização após reatores UASB. No entanto, tratamentos que combinam UASB + lagoas raramente atingem padrões de lançamento de agências regulatórias. Por outro lado, UASB seguido de métodos aeróbios de alta taxa fornecem efluentes com baixa DQO residual, com valores abaixo de 50 mg L^{-1} (KHAN et al., 2011).

3.4 O Metano

Atualmente, a matriz energética mundial é muito dependente dos combustíveis fósseis, como petróleo, carvão mineral e gás natural. A medida que se prevê o esgotamento dessas fontes de energia não-renováveis, surge a necessidade de buscar outras fontes que as substituam. Ao mesmo tempo, o volume de resíduos orgânicos e águas residuárias produzidos aumenta anualmente.

O metano derivado do tratamento anaeróbio de resíduos orgânicos é um gás inodoro e incolor, e possui elevado potencial de utilização como combustível alternativo. Além disso, o gás é facilmente separado do líquido, o que contribui na redução de custos do processo, se comparado a biocombustíveis líquidos, como o etanol (TABATABAEI et al., 2010). O biogás produzido na digestão anaeróbia de esgotos domésticos é composto majoritariamente por metano (70 a 80%),

nitrogênio (10 a 25%) e gás carbônico (5 a 10%) (CHERNICHARO et al., 2015).

Estimativas apontam que a metanogênese é responsável pela geração de aproximadamente um bilhão de toneladas (1 Gt) de metano por ano no mundo todo, em locais como pântanos, sedimentos aquáticos, solos alagados de plantio de arroz, aterros de resíduos, entre outros, com implicações importantes na produção de combustível e no aquecimento global. A concentração de metano na atmosfera nos últimos 100 anos aumentou de 0,9 a 1,8 ppm, um dado preocupante já que o metano é um potente gás de efeito estufa (THAUER et al., 2008; COSTA; LEIGH, 2014).

O metano produzido pela remoção de DQO em reatores anaeróbios pode ser recuperado (28% a 75%) e transformado em energia. Em termos energéticos, 1 m³ de biogás contendo 75% de metano equivale a 1,4 kWh de energia elétrica. O biogás pode ser utilizado para alimentar geradores ou em iluminação pública (KHAN et al., 2011).

Apesar do potencial do elevado poder calorífico do metano, a utilização efetiva do biogás para geração de energia ainda é pouco aplicada, e a grande maioria das estações de tratamento de esgoto realizam a queima do mesmo sem o aproveitamento energético. Além disso, problemas na captação do gás podem resultar em redução do potencial energético, incluindo o metano que permanece dissolvido na fase líquida, possíveis vazamentos, intrusões de água de chuva que causam diluição do esgoto e conseqüente redução na produção de biogás, e a falta de controle e conhecimento em relação à composição do biogás e o volume produzido, dificultando a avaliação do real potencial energético dos sistemas de tratamento (CHERNICHARO et al., 2015).

A biomassa abundante de diversas indústrias poderia ser utilizada como matéria-prima para produção de metano, combinando tratamento de resíduos e efluentes com geração de energia. Dejetos animais, resíduos agrícolas, resíduos sólidos urbanos, esgoto doméstico, resíduos de indústrias alimentícias e florestais são exemplos de fontes de biomassa que poderiam ser transformadas em biogás. Estima-se que no futuro pelo menos 25% de toda a bioenergia produzida seja derivada de biogás produzido a partir de resíduos. Além de constituir uma fonte de energia, a conversão de resíduos a metano também contribui intensamente na redução das emissões de gases de efeito estufa, já que evita perdas de gás metano para a atmosfera (TABATABAEI et al., 2010).

A produção de metano vem ganhando atenção dos países da União Européia, por reduzir a dependência na importação de gás natural, e por permitir o transporte e utilização em locais

distantes de onde foi produzido. Atualmente, estuda-se o armazenamento de excessos de energia de fontes eólica e solar, transformando-a para H_2 por meio de eletrólise aquosa, e o H_2 em metano ao combiná-lo com biogás em reatores contendo arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, que transformarão o CO_2 do biogás e o H_2 em CH_4 . A digestão anaeróbia de resíduos orgânicos já é um sistema bem estabelecido para produção de energia renovável na União Européia, fornecendo biogás contendo 30-40% de CO_2 e 60-70% de CH_4 . O biogás pode ser melhorado por meio deste sistema, aumentando a concentração de metano no gás, o que aumenta o calor específico e o potencial energético (ALFARO et al., 2018).

O biogás recuperado pode ser utilizado diretamente em caldeiras e fornos para substituir outros combustíveis, para gerar energia elétrica, na cogeração de eletricidade e calor, ou como combustível alternativo para injeção nas linhas de gás natural e utilização em veículos a gás (CHERNICHARO et al., 2015; ALFARO et al., 2018).

3.5 Tecnologias dependentes e independentes de cultivo para a identificação de microrganismos metanogênicos

A biologia molecular surgiu a partir da descoberta da estrutura química da molécula de DNA por Watson e Crick na década de 50, e possui atualmente aplicações em diversos campos da ciência e biotecnologia, especialmente na área de medicina (PINHO, 2006).

As estimativas da diversidade de comunidades microbianas costumavam depender somente de técnicas de cultivo de microrganismos, porém, atualmente os métodos moleculares de análise de DNA permitem a avaliação de toda a comunidade bacteriana, inclusive os microrganismos que não podem ser cultivados em laboratório (AMHA et al., 2018). Os microrganismos são frequentemente identificados por meio da análise do gene RNAr 16S, sendo realizada inicialmente a extração do DNA total, seguida pela técnica de PCR, cujos produtos são clonados em vetores, selecionados e sequenciados. O sequenciamento é então buscado em bancos de dados genômicos por homologia da sequência, os quais contam com informações taxonômicas e filogenéticas da linhagem correspondente à sequência estudada (LUCENA, 2008).

A análise de sequenciamento do gene RNAr 16S, uma das técnicas mais utilizadas atualmente, consiste em uma tecnologia independente de cultivo para identificação de microrganismos. Técnicas dependentes de cultivo são utilizadas para obter culturas isoladas de microrganismos (KURODA et al., 2014), por meio do favorecimento de microrganismos que

crecem em determinadas condições e exigências nutricionais (VICH, 2010).

Os grânulos metanogênicos formados em reatores são comunidades microbianas complexas. Técnicas de biologia molecular fornecem informações importantes sobre a posição filogenética de microrganismos nutricionalmente dependentes uns dos outros. Alguns desses microrganismos são difíceis de cultivar, devido às diversas condições especiais de crescimento que demandam. Técnicas como a extração, clonagem e sequenciamento de DNA e RNA fornecem informações a respeito de quais microrganismos estão presentes no sistema e quais são mais ativos (DÍAS et al., 2006). Métodos moleculares podem ser utilizados no biomonitoramento de sistemas de tratamento anaeróbio a fim de evitar falhas e otimizar a produção de metano, além de possibilitar a identificação de novas espécies envolvidas (TABATABAEI et al., 2010).

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e a hibridização fluorescente *in situ* (FISH, do inglês *Fluorescent In Situ Hybridization*) são frequentemente utilizadas em estudos de microbiologia ecológica, fornecendo resultados satisfatórios na detecção de mudanças na composição microbiana ao longo do tempo ou na comparação de composição microbiana entre reatores diferentes. A DGGE possui aplicação em diversas formas de monitoramento de sistemas biológicos, como na análise da biodiversidade de lodo granular, na comparação de *start-up* e evolução de reatores, na investigação de mudanças na população em reatores, na determinação da diversidade de populações e na análise da dinâmica da população microbiana em reatores anaeróbios. Já a estrutura dos grânulos, a distribuição microbiana de populações, e a topografia e biodiversidade são analisadas por FISH (DÍAZ et al., 2006).

Porém, esses métodos moleculares inicialmente desenvolvidos apresentam resultados limitados que podem dificultar a análise da alta diversidade de lodos anaeróbios e da importância de populações com menores abundâncias para o equilíbrio dos microbiomas (AMHA et al., 2018).

Já na última década, técnicas de metagenômica baseadas no sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*) vêm crescendo na pesquisa de microrganismos dos mais diversos habitats. Metagenômica avalia o conteúdo genômico de comunidades microbianas, fornecendo dados acerca da estrutura e função da mesma, e assim permitindo a obtenção de informação sobre organismos que não podem ser facilmente cultivados. No NGS, o DNA extraído de um organismo ou amostra ambiental é fragmentado, e cada

fragmento é sequenciado em paralelo em escala de micrômetro, sendo cada reação de sequenciamento individual registrada separadamente, possibilitando a realização de milhões de reações de sequenciamento paralelas e a identificação de todo o DNA presente em uma amostra em uma única corrida do equipamento. Os instrumentos da Illumina são os mais utilizados no mercado devido ao seu custo-benefício e à alta precisão de sequenciamento (JÜNEMANN et al., 2017).

3.6 Atividade Metanogênica Específica

A eficiência de tratamento de um sistema anaeróbio é dependente da atividade microbiológica da biomassa presente nos reatores, sendo que a remoção propriamente dita dos compostos orgânicos do efluente ocorre na metanogênese e pode ser quantificada pela atividade metanogênica específica.

A atividade metanogênica específica (AME) determina a capacidade máxima de produção de metano de uma determinada biomassa anaeróbia, por meio de teste realizado em laboratório com condições controladas, a fim de viabilizar a máxima atividade bioquímica para conversão da matéria orgânica a biogás (AQUINO et al., 2007), utilizando substratos específicos e onde a disponibilidade deste não seja um fator limitante (HUSSAIN; DUBEY, 2013). O teste de AME vem sendo utilizado para monitorar o desempenho de reatores anaeróbios e avaliar o potencial da biomassa em converter o substrato em metano (BARROS et al., 2010).

Além de ser utilizado como análise de rotina para avaliar a atividade metanogênica de lodos anaeróbios, o teste de AME possui outras aplicações, como (AQUINO et al, 2007):

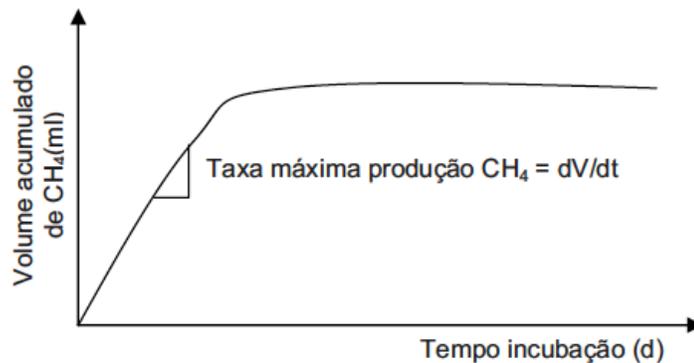
- Avaliar o comportamento da biomassa sob o efeito de compostos inibidores;
- Determinar a toxicidade relativa de compostos presentes em efluentes;
- Estabelecer o grau de biodegradabilidade de substratos;
- Monitorar mudanças de atividade do lodo pela acumulação de materiais inertes;
- Determinar a carga orgânica máxima que pode ser aplicada, ou ainda a massa mínima de lodo a ser mantida no reator para desempenho satisfatório do sistema;
- Avaliar parâmetros cinéticos.

O tratamento eficiente de um efluente depende principalmente da quantidade de microrganismos metanogênicos ativos em um reator anaeróbio. No entanto, a avaliação dos

sólidos suspensos voláteis inclui a mensuração tanto de biomassa microbiana quanto de matéria orgânica particulada presente, além de não fornecer nenhum indicativo do potencial metanogênico da biomassa. Sendo assim, do ponto de vista de design e operação de sistemas anaeróbios, a atividade metanogênica específica é de especial importância (HUSSAIN; DUBEY, 2013).

Na prática, o teste de AME relaciona uma determinada quantidade de biomassa (gSTV) e de substrato (gDQO), sob condições controladas, e avalia a produção de metano ao longo de certo período de tempo, calculando a AME a partir das taxas de produtividade máxima de metano, (em mL de CH₄ por grama de STV por dia ou mg de DQO removida na forma de CH₄ por grama de STV por dia – Figura 3.2) (BARROS et al., 2010; CAMPOS, 1999). O ensaio mede a velocidade da fase metanogênica, e associado à quantificação da biomassa, fornece o potencial metanogênico máximo de um reator operando sob condições supostamente ideais (ABREU; ARAUJO, 2011).

Figura 3.2 – Determinação gráfica da taxa máxima de produção de metano.



Fonte: Aquino et al. (2007).

Para avaliar a atividade metanogênica do lodo, deve-se alimentar a biomassa com substratos que favoreçam essa etapa do processo. Para isso, utiliza-se como substrato para o teste uma mistura de ácidos orgânicos voláteis, sendo normalmente acetato, propionato e butirato. Assim, o teste irá verificar, além da atividade dos microrganismos metanogênicos, a capacidade sintrófica entre estes e os microrganismos acetogênicos, visto que os metanogênicos necessitam da boa atividade dos organismos produtores de acetato para geração de metano (AQUINO et al, 2007). O teste de AME com acetato como substrato irá verificar apenas a atividade das arqueias metanogênicas acetoclásticas, enquanto a utilização de propionato permite a quantificação

também das bactérias acetogênicas e das arqueias hidrogenotróficas. A atividade metanogênica pode então prever a situação da biomassa de um reator, bem como determinar a capacidade potencial de carga orgânica a ser aplicada no reator anaeróbio (VELUCHAMY; KALAMDHAD, 2017).

Barros et al. (2010) realizaram teste de AME com lodo de um reator UASB em escala de laboratório (60L) em fase de *start-up* tratando esgoto doméstico, operado em batelada. O teste foi realizado utilizando acetato de sódio como substrato, e incubação a 30°C com agitação, com medição direta do volume de metano gerado por meio da passagem do biogás em frascos contendo NaOH, obtendo resultado de AME de 0,017 mgDQO_{CH4}/mgSSV.d durante o período de *start-up*, sendo que, de acordo com os autores, valores médios esperados para sistemas estáveis ficam em torno de 0,14 mgDQO_{CH4}/mgSSV.dia.

Utilizando solução de nutrientes e solução dos ácidos orgânicos acético, propiônico e butírico, Schneiders et al. (2013) avaliaram a atividade metanogênica específica de lodo de reator UASB tratando efluente de uma indústria alimentícia, em frascos incubados a 33°C com agitação. A medição do biogás foi realizada pela passagem do biogás por frascos contendo NaOH e medição direta do volume de metano produzido, resultando em AME de 0,17 gDQO_{CH4}/gSSV.d.

Rocha et al. (2001) avaliaram a AME de lodo de reatores UASB tratando esgoto doméstico, efluente de cervejaria e de fábrica de alimentos de processamento de milho, em relação à diferentes concentrações de substrato e biomassa no teste. Os frascos foram incubados a 30°C sem agitação, utilizando acetato de sódio como substrato, e o biogás passou por frascos contendo NaOH para medição direta do volume de metano produzido. Para o lodo de esgoto doméstico, a atividade máxima obtida foi de 0,21 gDQO_{CH4}/gSSV.d, com concentração de acetato e de biomassa de 2 gDQO/L e 0,57 gSSV/L, respectivamente. O lodo de cervejaria apresentou AME de 1,26 gDQO_{CH4}/gSSV.d para concentração de biomassa e de substrato de 0,58 gSSV/L e 4g DQO/L, chegando a 1,74 gDQO_{CH4}/gSSV.d mantendo-se a concentração de substrato e reduzindo a concentração de biomassa para 0,23 gSSV/L. Para o lodo da fábrica de alimentos, a AME máxima foi de 1,20 gDQO_{CH4}/gSSV.d para concentrações de biomassa e de substrato de 0,25 gSSV/L e 4 gDQO/L, respectivamente. O estudo demonstrou que a AME diminui com o aumento da concentração de sólidos suspensos, e aumenta com o aumento da concentração de substrato.

Zhang et al. (2018) avaliaram a operação de um reator UASB em escala piloto tratando

esgoto doméstico com redução gradual da temperatura de operação de 20°C até 10°C e utilizaram a AME como um dos parâmetros de monitoramento ao longo das fases do experimento, e encontraram valores na faixa de 0,24 – 0,27 gDQO_{CH4}/gSSV.d.

Moncada e Silva (2016) utilizaram a AME para avaliar a viabilidade de utilização de esterco bovino como inóculo para tratamento de resíduos de cozinha. A atividade do inóculo foi avaliada utilizando diferentes substratos, a fim de observar cada uma das etapas da digestão anaeróbia separadamente. A metanogênese foi avaliada nas duas rotas metabólicas, sendo realizados testes utilizando acetato e formiato como substratos, além de soluções de nutrientes e vitaminas, incubados a 39°C sem agitação. Foram obtidos resultados de 0,60 gDQO_{CH4}/gSSV.d para o teste que avaliou a metanogênese acetoclástica, com acetato como substrato, e 0,68 gDQO_{CH4}/gSSV.d para o teste que avaliou a metanogênese hidrogenotrófica, utilizando formiato como substrato. A maior AME para a via hidrogenotrófica foi atribuída ao fato de que o formiato é transformado em H₂ e CO₂, que pode ser convertido em metano pelas hidrogenotróficas, ou em acetato por bactérias homoacetogênicas e então em metano pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas.

Hussain e Dubey (2013) realizaram o monitoramento da aclimação de um reator para digestão de fenol utilizando testes de AME em cada fase do processo, aumentando a concentração de fenol na alimentação do reator e alterando as concentrações de nutrientes (C:N:P). Os autores realizaram testes de AME com acetato e com benzoato como substratos, e encontraram valores de 0,21 a 0,40 gDQO_{CH4}/gSSV.d com acetato e de 0,28 a 0,47 gDQO_{CH4}/gSSV.d com benzoato nas diferentes fases do processo.

Alves, Cammarota e França (2005) utilizaram testes de AME para avaliar a inibição da biomassa anaeróbia por substâncias presentes em efluentes de laboratório de pesquisa, utilizando o efluente do Laboratório de Tecnologia Ambiental da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Estas substâncias são oriundas dos reagentes químicos das análises realizadas em laboratório, considerando que, até aquela data, poucas universidades empregavam a segregação e descarte adequados aos resíduos, que acabavam sendo lançados na rede de esgoto local, comprometendo a eficiência das estações de tratamento. Para os ensaios, utilizou-se lodo de reator UASB de uma indústria alimentícia, alimentado com esgoto doméstico bruto, solução de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico e butírico) e solução nutriente, incubados a 35°C. A medição do metano foi realizada por coleta e medição do biogás, e análise

da composição (% de metano) por meio de cromatografia gasosa. A AME controle permaneceu na faixa de 0,10 – 0,16 gDQO_{CH4}/gSSV.d. Os autores observaram que os elementos sódio, cromo, fenol e sulfato, além das interações sulfato-mercúrio e sulfato-sódio apresentaram os maiores efeitos sobre o percentual de inibição da AME.

Cordeiro et al. (2018) avaliaram o lodo de dois reatores UASB em escala piloto tratando esgoto doméstico por meio de análise da composição do biogás por cromatografia gasosa e por meio de sistema automatizado de AME, sendo a incubação realizada a 35°C com acetato como substrato. Para os reatores tratando esgoto doméstico, os autores encontraram AME de 0,09 e 0,10 gDQO_{CH4}/gSTV.d no sistema automatizado, e 0,30 e 0,26 gDQO_{CH4}/gSTV.d por cromatografia gasosa.

Os dados da literatura quanto à ensaios de AME estão sumarizados na Tabela 3.5, sendo que valores usuais para AME de lodo tratando esgoto doméstico estão na faixa de 0,10 a 0,4 gDQO/gSTV.d (CHERNICHARO, 2007).

Tabela 3.5 – Revisão da literatura quanto à ensaios de AME.

Fonte do inóculo	Substrato	Temperatura	Método de medição de CH ₄	AME	Referência
UASB (<i>start-up</i>) – esgoto doméstico	Acetato de sódio	30°C com agitação	Lavagem do biogás em NaOH	0,017 mgDQO _{CH4} /mgSSV.d	Barros et al. (2010)
UASB – efluente de indústria alimentícia	Ácido acético, propiônico e butírico	33°C com agitação	Lavagem do biogás em NaOH	0,17 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Schneiders et al. (2013)
UASB – esgoto doméstico	Acetato de sódio	30°C sem agitação	Lavagem do biogás em NaOH	0,21 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Rocha et al. (2001)
UASB – efluente de cervejaria	Acetato de sódio	30°C sem agitação	Lavagem do biogás em NaOH	1,74 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Rocha et al. (2001)
UASB – efluente de indústria alimentícia	Acetato de sódio	30°C sem agitação	Lavagem do biogás em NaOH	1,20 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Rocha et al. (2001)
UASB (piloto) – esgoto doméstico	Acetato de sódio	10 a 35°C com agitação	Método manométrico	0,24 – 0,27 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Zhang et al. (2018)
Esterco bovino	Acetato de sódio	39°C sem agitação	Lavagem do biogás em NaOH	0,60 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Moncada e Silva (2016)
Esterco bovino	Formiato	39°C sem agitação	Lavagem do biogás em NaOH	0,68 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Moncada e Silva (2016)

UASB – efluente contendo fenol	Acetato	30 – 32°C sem agitação	Lavagem do biogás em NaOH	0,21 a 0,40 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Hussain e Dubey (2013)
UASB – efluente contendo fenol	Benzoato	30 – 32°C sem agitação	Lavagem do biogás em NaOH	0,28 a 0,47 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Hussain e Dubey (2013)
UASB – efluente de indústria alimentícia	Ácido acético, propiônico e butírico	35°C sem agitação	Análise da composição do biogás por cromatografia	0,10 – 0,16 gDQO _{CH4} /gSSV.d	Alves, Cammarota e França (2005)
UASB (piloto) – esgoto doméstico	Acetato de sódio	35°C sem agitação	Análise da composição do biogás por cromatografia	0,30 e 0,26 gDQO _{CH4} /gSTV.d	Cordeiro et al. (2018)

REFERÊNCIAS

- ABREU, E. F. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário**. 2007. 93 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ABREU, E. F.; ARAÚJO, J. C. Ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) para Lodos Anaeróbios. Procedimento Operacional Padrão. 27 p. Belo Horizonte : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental / UFMG, 2011.
- AGDAG, O. N.; SPONZA, D. T. Effect of alkalinity on the performance of a simulated landfill bioreactor digesting organic solid wastes, **Chemosphere**, v. 59, p. 871-879, 2005.
- ALFARO, N. et al. Evaluation of process performance, energy consumption and microbiota characterization in a ce-ramic membrane bioreactor for ex-situ biomethanation of H₂ and CO₂. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 142-150, 2018.
- ALVES, L. C.; CAMMAROTA, M. C.; FRANÇA, F. P. Inibição de lodo biológico anaeróbio por constituintes de efluente de laboratório de controle de poluição. **Eng. sanit. ambient.** v. 10, n. 3, p. 236-242, 2005.
- AMHA, Y. M. et al. Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 999 – 1014, 2018.
- ANTWI, P. et al. Functional bacterial and archaeal diversity revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing during potato starch processing wastewater treatment in an UASB, **Bioresource Technology**, v. 235, p. 348 – 357, 2017.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em lodos anaeróbios. **Eng. Sanit. ambient.** v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007.
- BANDARA, W. M. K. R. T. W. et al. Anaerobic treatment of municipal wastewater at ambient temperature: Analysis of archaeal community structure and recovery of dissolved methane, **Water Research**, v. 46, p. 5756-5764, 2012.
- BARROS, A. R. M. et al. Acompanhamento da partida de reator UASB através da atividade metanogênica específica – AME. In: V Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação – CONNEPI 2010, **Anais de congresso**, Maceió, 2010.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Saneamento – SNS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2017. 226 p. Brasília : SNS/MDR, 2019.
- CAMPOS, J. R. (Coord.). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Projeto PROSAB. 464 p. Rio de Janeiro : ABES, 1999.

CARDOSO, A. M. et al. Archaea: Potencial Biotecnológico. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 30, 2003.

CHERNICHARO, C. A. L. et al. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v. 114, p. 649-679, 2015.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Vol. 5 – Reatores Anaeróbios**. 246 p. Belo Horizonte : UFMG, 2007.

CORDEIRO, A. L. et al. Atividade Metanogênica Específica: Metodologias simplificada e automatizada para lodos de reatores anaeróbios. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 5, p. 661-665, 2018.

COSTA, K. C.; LEIGH, J. A. Metabolic versatility in methanogens. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, p. 70-75, 2014.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass, **Rev Environ Sci Biotechnol** v. 7, p. 173-190, 2008.

DÍAZ, E. E. et al. Phenotypic Properties and Microbial Diversity of Methanogenic Granules from a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor Treating Brewery Wastewater, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4942-4949, 2006.

GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v. 6, p. 205 – 226, 2000.

JÜNEMANN, S. et al. Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. **Journal of Biotechnology**, v. 261, p. 10-23, 2017.

HUSSAIN, A.; DUBEY, S. K. Specific methanogenic activity test for anaerobic treatment of phenolic wastewater. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, p. 7015-7025, 2013.

KHAN, A. A. et al. Sustainable options of post treatment of UASB effluent treating sewage: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 55, p. 1232-1251, 2011.

KNITTEL, K.; BOETIUS, A. Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 311-334, 2009.

KURODA, K. et al. Community Composition of Known and Uncultured Archaeal Lineages in Anaerobic or Anoxic Wastewater Treatment Sludge. **Microb Ecol**, v. 69, p. 586-596, 2014.

LECKER, B. et al. Biological hydrogen methanation – A review. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1220 – 1228, 2017.

LETTINGA, G. et al. Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) Reactor Concept for Biological Wastewater Treatment, Especially for Anaerobic Treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 699-734, 1980.

LETTINGA G. et al. High-Rate Anaerobic Waste-Water Treatment Using the UASB Reactor under a Wide Range of Temperature Conditions, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 2, p. 253-284, 1984.

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 67, p. 3-28, 1995.

LEW, B. et al. UASB reactor for domestic wastewater treatment at low temperatures: a comparison between a classical UASB and hybrid UASB-filter reactor. **Water Science and Technology**, v. 49, n. 11-12, p. 295-301, 2004.

LOPES, T. R. **Caracterização do esgoto sanitário e lodo proveniente de reator anaeróbio e de lagoas de estabilização para avaliação da eficiência na remoção de contaminantes**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais), UTFPR, 2015.

LUCENA, R. M. **Identificação molecular da diversidade microbiana em Reator UASB de Estação de Tratamento de Esgoto**. Dissertação (Mestrado em Genética), UFPE, 2008.

MATOS, M. P. et al. Estimativa da produção e perdas de metano por diferentes modelos em reator UASB da ETE-UFLA. In: 30º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, **Anais de Congresso**, Natal/RN, 2019.

METCALF, L.; EDDY, H. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4 ed. Revisado por George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. David Stensel. New York : McGraw-Hill, 2003.

MONCADA, M. S. A.; SILVA, M. Q. Characterization of trophic groups throughout an anaerobic digestion process with cattle manure slurry using a low-cost method. **Rev. Ion**. v. 29, n. 1, p. 117-123, 2016.

NUVOLARI, A. **Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola**. Edgard Blucher: São Paulo, 2003.

PINHO, M. S. L. P. Pesquisa em Biologia Molecular: Como fazer? **Rev Bras Coloproct**, v. 26, n. 3, 2006.

ROCHA, M. A. G. et al. Avaliação e comparação entre a atividade metanogênica específica de lodos de esgotos doméstico e industriais. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Anais de Congresso**, João Pessoa/PB, 2001.

SCHINK, B.; STAMS, A. J. M. Syntrophism among Prokaryotes, **The Prokaryotes**, v. 2, p. 309 – 335, 2006.

SCHNEIDERS, D. et al. Atividade metanogênica específica (AME) de lodos industriais provenientes do tratamento biológico aeróbio e anaeróbio, **Ambi-Água**, v. 8, n. 2, p. 135-145, 2013.

SEGHEZZO, L. et al. A Review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB

reactors. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 175-190, 1998.

SINISCALCHI, L. A. B. **Enriquecimento de micro-organismos metanotróficos e avaliação do potencial de oxidação anaeróbia de metano a partir de lodo de reator UASB**. 2015. 199 p. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SOUZA, C. L. **Estudo das rotas de formação, transporte e consumo dos gases metano e sulfeto de hidrogênio resultantes do tratamento de esgoto doméstico em reatores UASB**. 2010. 127 p. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

TABATABAEI, M. et al. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments, **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1214 – 1225, 2010.

THAUER, R. K. et al. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 579 – 591, 2008.

VELUCHAMY, C.; KALAMDHAD, A. S. Biochemical methane potential test for pulp and paper mill sludge with different food / microorganisms ratios and its kinetics. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 197 – 204, 2017.

VICH, D. V. **Comunidade microbiana e produção de metano em reator anaeróbio em batelada com metilamina como fonte de carbono**. 2010. 148 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte : Editora UFMG, 2005.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

ZHANG, L. et al. Anaerobic treatment of raw domestic wastewater in a UASB-digester at 10°C and microbial community dynamics. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 2088-2097, 2018.

PARTE 2

4 ARTIGO 1

5 ARTIGO 2

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 ARTIGO 1: ANÁLISE DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA DE LODO DE REATOR UASB TRATANDO ESGOTO SANITÁRIO

RESUMO

A Atividade Metanogênica Específica (AME) consiste na determinação do potencial máximo de geração de metano pela comunidade microbiana selecionada e contida dentro de um sistema. Por meio de um teste de laboratório são fornecidas as condições ótimas a fim de favorecer o metabolismo de arqueias metanogênicas para a produção de metano. O presente estudo teve como finalidade avaliar o potencial máximo de geração de metano em lodo anaeróbio de um reator UASB da ETE-UFLA por meio do ensaio de AME, a qual foi avaliada utilizando acetato de sódio como substrato à temperatura de 30°C, com lavagem do gás em solução alcalina e medição direta do volume de metano produzido. O resultado mais satisfatório de AME obtido foi de 0,055 gDQO_{CH₄}/gSTV.d, sendo observada significativa alteração no resultado no caso de uma perturbação operacional da ETE, demonstrando o potencial deste ensaio como parâmetro de monitoramento de sistemas anaeróbios. Os resultados estimam que cada reator UASB da ETE teria capacidade de converter 117 kgDQO d⁻¹ em CH₄, produzindo quase 46 m³ d⁻¹ de gás metano.

Palavras-chave: Arqueias metanogênicas. Lodo Anaeróbio. Reator UASB.

ABSTRACT

The specific methanogenic activity (SMA) is the determination of the maximum potential of methane production by the microbial community contained within a system. Through a laboratory test, optimum conditions are provided in order to favor the metabolism of methanogenic archaeas to produce methane. The objective of this study was to evaluate the maximum potential of methane generation by the anaerobic sludge from a UASB reactor in the wastewater treatment plant of the Federal University of Lavras using the SMA test, which was performed using sodium acetate as substrate at 30°C, through biogas washing in alkaline solution and direct measurement of the volume of methane produced. The most satisfactory SMA result obtained was 0.055 gCOD_{CH₄}/gTVS.day, while a significant change in the result was observed in the case of an operational disturbance in the STP, indicating the potential of this test as a monitoring parameter in anaerobic systems. The results estimate that each UASB reactor in the STP would be able to convert 117 kgCOD day⁻¹ to CH₄, producing almost 46 m³ day⁻¹ of methane.

Keywords: Anaerobic Sludge. Methanogenic Archaeas. Specific Methanogenic Activity. UASB Reactor.

4.1 Introdução

A digestão anaeróbia é o processo por meio do qual um grupo de microrganismos, em ambiente livre de oxigênio, realiza a conversão de compostos orgânicos em produtos mais simples, em especial metano e gás carbônico. Uma das principais vantagens da digestão anaeróbia está na possibilidade de recuperação do gás metano produzido e sua utilização para geração de energia, seja pela sua queima direta ou pelo melhoramento do biogás para uso como combustível para transporte (VASCO-CORREA et al., 2018).

Esse processo ocorre em etapas sequenciais dependentes de diferentes grupos de microrganismos especializados, que são: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na hidrólise ocorre a quebra de polímeros, como proteínas, carboidratos e gorduras em substâncias mais simples, como açúcares e aminoácidos. Na acidogênese os produtos da hidrólise são convertidos em ácidos orgânicos voláteis, como propionato e butirato (LECKER et al., 2017). O ácido acético é usualmente o intermediário mais abundante em sistemas de digestão anaeróbia, sendo o precursor de cerca de 72% do metano produzido por lodo de ETEs (CHERNICHARO, 2007).

Na acetogênese, bactérias acetogênicas oxidam os subprodutos da acidogênese, convertendo-os em hidrogênio, gás carbônico e acetato, substratos adequados para a metanogênese (LECKER et al., 2017). Por fim, na metanogênese ocorre a transformação da matéria orgânica em metano e gás carbônico pela atividade das arqueias metanogênicas, as quais podem ser divididas em dois grupos principais em função da afinidade por determinado substrato: as acetoclásticas, que geram metano a partir do acetato; e as hidrogenotróficas, que produzem metano a partir da redução do CO_2 utilizando o H_2 como doador de elétrons (CHERNICHARO, 2007; ABREU, 2007).

Em sistemas anaeróbios, é desejável que se obtenha o máximo de conversão de matéria orgânica em metano possível, não só pela possibilidade de utilização energética do gás, mas porque a matéria orgânica (em DQO) é removida efetivamente da fase líquida ao ser convertida para metano, que apresenta baixa solubilidade e se desprende do líquido, promovendo eficiência na remoção da carga orgânica do sistema (SOUZA, 2010). O biogás produzido na digestão anaeróbia de esgotos domésticos é composto majoritariamente por metano (70 a 80%), nitrogênio (10 a 25%) e gás carbônico (5 a 10%) (CHERNICHARO et al., 2015). Em termos energéticos, 1

m³ de biogás contendo 75% de metano equivale a 1,4 kWh de energia elétrica (KHAN et al., 2011).

O potencial máximo de geração de metano de determinada biomassa em um reator anaeróbio pode ser obtido pela Atividade Metanogênica Específica (AME), um teste de laboratório que fornece as condições ótimas para conversão de matéria orgânica em metano. O teste de AME pode ser utilizado como parâmetro de monitoramento em reatores anaeróbios e como controle operacional desta etapa de tratamento. Neste sentido, é possível estimar a carga máxima a ser aplicada que não provoque um desequilíbrio na comunidade microbiana e, conseqüentemente, possibilite um melhor funcionamento do sistema (AQUINO et al., 2007; HUSSAIN; DUBEY, 2017).

Na prática, o teste de AME relaciona uma determinada quantidade de biomassa (gSTV) e de substrato (gDQO), sob condições controladas, e avalia a produção de metano ao longo de certo período de tempo, calculando a AME a partir das taxas de produtividade máxima de metano (em mL de CH₄ por grama de STV por dia ou mg de DQO removida na forma de CH₄ por grama de STV por dia) (BARROS et al., 2010).

Pelo fato de o efluente gerado na UFLA apresentar características consideravelmente distintas das normalmente observadas em esgoto sanitário, e serem observados problemas na captação do biogás produzido, como baixa vazão de gás alimentando os *bags* de armazenamento (CAMPOS, 2019), o presente trabalho teve como finalidade a avaliação do potencial máximo de geração de metano por digestão anaeróbia em um reator UASB localizado na ETE-UFLA, de forma a corroborar na operação adequada desses sistemas fornecendo informações técnicas aos responsáveis pelo processo e com vistas ao aproveitamento energético do biogás gerado.

Pelo fato de o efluente gerado na UFLA apresentar características consideravelmente distintas das normalmente observadas em esgoto,

4.2 Material e Métodos

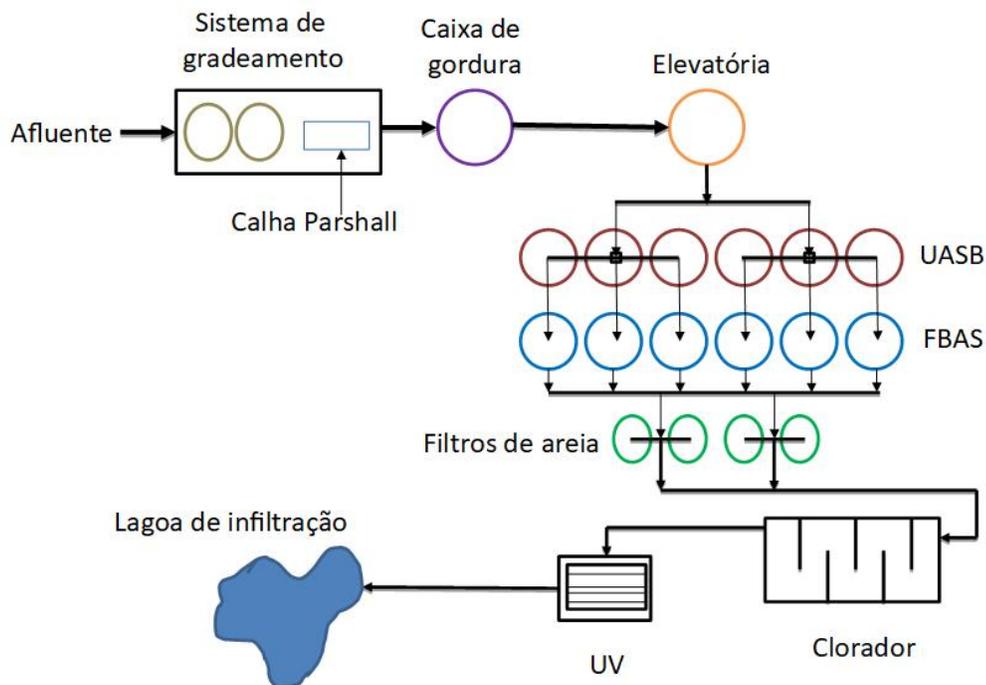
4.2.1 Caracterização da área de estudo

O presente trabalho teve como objeto de estudo os reatores UASB em funcionamento na Estação de Tratamento de Esgoto da Universidade Federal de Lavras (ETE-UFLA), localizada

em Lavras/MG. A ETE, operada pela UFLA, realiza o tratamento dos efluentes gerados no campus e demais áreas da universidade, em funcionamento desde 2016. Os resíduos químicos gerados nos laboratórios são armazenados e tratados separadamente pelo Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos da UFLA ou por empresa terceirizada e, portanto, não integra os efluentes tratados pela ETE-UFLA.

O tratamento preliminar conta com grades grossa e fina, seguido de caixa de gordura. O tratamento biológico é realizado por sistemas com reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*) seguidos por Filtros Biológicos Aerados Submersos (FBAS). O efluente ainda passa por filtros de areia, e segue para desinfecção em clorador e radiação UV, sendo então lançado em lagoa de passagem e deságua em um córrego. As etapas de tratamento do esgoto realizadas na ETE-UFLA estão representadas esquematicamente na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Esquema das etapas de tratamento da ETE-UFLA

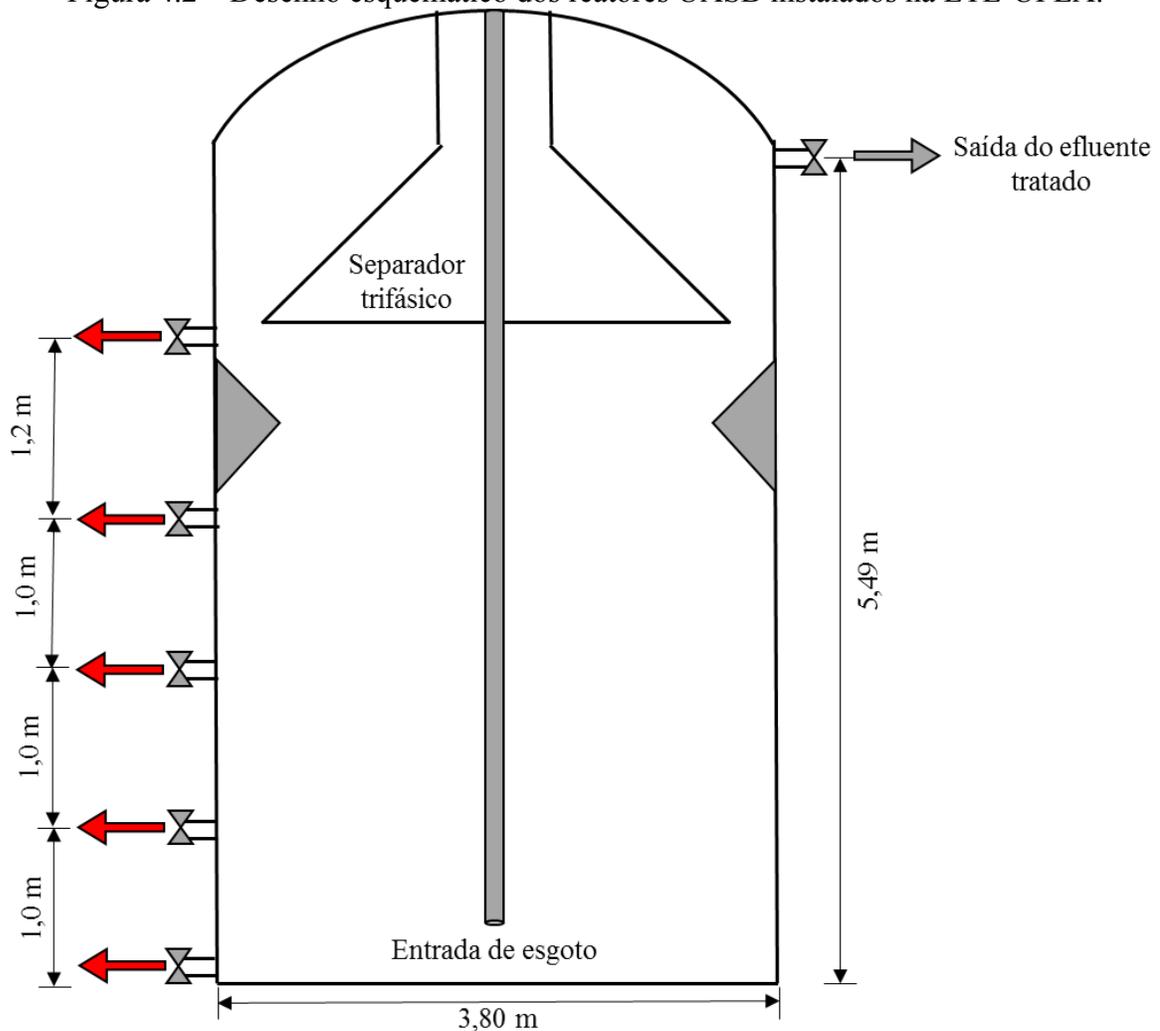


Fonte: Fialho (2018).

Em um dia normal, a ETE trata em torno de 150 a 200 m³ de esgoto sanitário, havendo contribuição de duas elevatórias que encaminham o esgoto de diferentes pontos da UFLA até a ETE. Uma terceira elevatória projetada ainda não está em funcionamento, a qual aumentará a vazão tratada pela ETE nos próximos anos.

A ETE conta com seis reatores UASB cilíndricos, com $62,3 \text{ m}^3$ de volume útil cada um e vazão projetada de até 150 m^3 por dia cada. Um desenho esquemático dos reatores está apresentado na Figura 4.2. O efluente tratado na ETE apresenta características bastante variáveis, apresentando DQO em torno de $847 \pm 652 \text{ mg L}^{-1}$ (MATOS, 2019), sendo que valores usuais para esgoto sanitário típico variam de 250 a 800 mg L^{-1} (METCALF; EDDY, 2003).

Figura 4.2 – Desenho esquemático dos reatores UASB instalados na ETE-UFLA.



Fonte: Do autor (2019).

4.2.2 Caracterização da biomassa presente nos reatores UASB

A fim de caracterizar os reatores UASB em termos de concentração de biomassa microbiana, realizou-se uma análise preliminar de todos os seis reatores (denominados de A, B,

C, D, E, F), coletando-se uma amostra de lodo de cada uma das alturas (conforme setas vermelhas na Figura 4.2). Assim, para cada reator, foram analisadas amostras dos cinco pontos quanto aos sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) para levantamento do perfil de sólidos dos reatores, além de análises de ST e STV para amostra composta dos cinco pontos, representando o reator como um todo. A amostra composta foi obtida pela mistura de um mesmo volume de cada uma das alturas. As análises da série de sólidos foram realizadas por gravimetria de acordo com a metodologia descrita por APHA, AWWA e WEF (2005). O valor de STV foi o parâmetro utilizado como estimativa da concentração de biomassa microbiana no sistema.

A partir dos valores de STV da amostra composta para cada reator, foi selecionado o que apresentou a maior concentração de biomassa para utilização nos testes de Atividade Metanogênica Específica. Temperatura e pH foram determinados utilizando medidor de pH de bancada mPA210 da marca MS TECNOPON, para fins de monitoramento.

As análises e ensaios descritos neste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Engenharia Ambiental e Sanitária, Departamento de Recursos Hídricos e Saneamento, da Universidade Federal de Lavras.

4.2.3 Atividade Metanogênica Específica

Os testes de Atividade Metanogênica Específica foram realizados de acordo com metodologia descrita por Aquino et al. (2007) com adaptações (utilização apenas de acetato de sódio como substrato, e STV como quantificação da biomassa, de acordo com Abreu e Araújo (2011)), sendo a quantificação do metano produzido realizada por dois métodos distintos.

Inicialmente, coletou-se amostra composta do reator UASB, porém, diferentemente da coleta descrita no item 4.2, utilizou-se apenas as amostras das quatro alturas inferiores, por entender-se que a altura superior já se encontra acima dos defletores e não compõe mais a manta de lodo. Determinou-se então a concentração de sólidos totais voláteis (STV) da amostra composta, a fim de se estimar a biomassa a ser inoculada nos testes, sendo realizada uma nova coleta a cada ensaio realizado (coletas em: ensaio 1 12/02/19; ensaio 2 11/06/19; ensaio 3 03/07/19; ensaio 4 20/08/19).

Durante a pesquisa, diversos sistemas experimentais foram utilizados para realização dos testes, sendo encontradas dificuldades em relação à vedação satisfatória dos frascos e ao

transporte adequado do gás produzido para o frasco de lavagem. Será apresentado o resultado de um sistema em que, da triplicata inoculada, apenas um dos frascos forneceu resultados, e o sistema final utilizado no restante do experimento.

Para os ensaios de AME utilizou-se solução de nutrientes composta por macronutrientes e micronutrientes, cujas soluções-estoque foram preparadas conforme as concentrações apresentadas nas Tabelas 4.1 e 4.2. Para preparar 1 L da solução de nutrientes foram utilizados 100 mL de solução de macronutrientes e 1 mL de micronutrientes, além de 0,2 g de extrato de leveduras como fonte adicional de vitaminas. Para o acetato de sódio, utilizou-se uma solução-estoque de 100 g L^{-1} . Os testes foram montados utilizando relação alimento por microrganismo de $0,5 \text{ gDQO gSTV}^{-1}$. Utilizou-se acetato de sódio como fonte de carbono, com concentração de acetato nos frascos de reação igual a 2 g L^{-1} (que resulta em concentração de DQO de $2,17 \text{ g L}^{-1}$) e, conseqüentemente, uma concentração de STV de $4,34 \text{ g L}^{-1}$ (ABREU; ARAUJO, 2011).

Tabela 4.1 – Concentrações das substâncias utilizadas no preparo da solução-estoque de micronutrientes.

Substância	Concentração
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$2,00 \text{ g L}^{-1}$
ZnCl_2	$0,05 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,03 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$0,50 \text{ g L}^{-1}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0,05 \text{ g L}^{-1}$
AlCl_3	$0,05 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$2,00 \text{ g L}^{-1}$
H_3BO_3	$0,01 \text{ g L}^{-1}$
HCl concentrado	1 mL L^{-1}

Fonte: Chernicharo (2007); Souto et al. (2010).

Tabela 4.2 – Concentrações das substâncias utilizadas no preparo da solução-estoque de macronutrientes.

Substância	Concentração
KH_2PO_4	$6,50 \text{ g L}^{-1}$
K_2HPO_4	$1,50 \text{ g L}^{-1}$
NH_4Cl	$5,00 \text{ g L}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$0,50 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \text{ g L}^{-1}$

Fonte: Chernicharo (2007); Souto et al. (2010).

Assim, adicionou-se aos frascos de reação o volume calculado da amostra composta de lodo, com base na análise de STV, juntamente com o volume necessário de acetato de sódio, e completou-se o volume de reação com a solução de nutrientes. Injetou-se gás inerte (N_2) nos frascos para lavagem da atmosfera e imposição do ambiente anaeróbio durante 2 minutos a 1 psi.

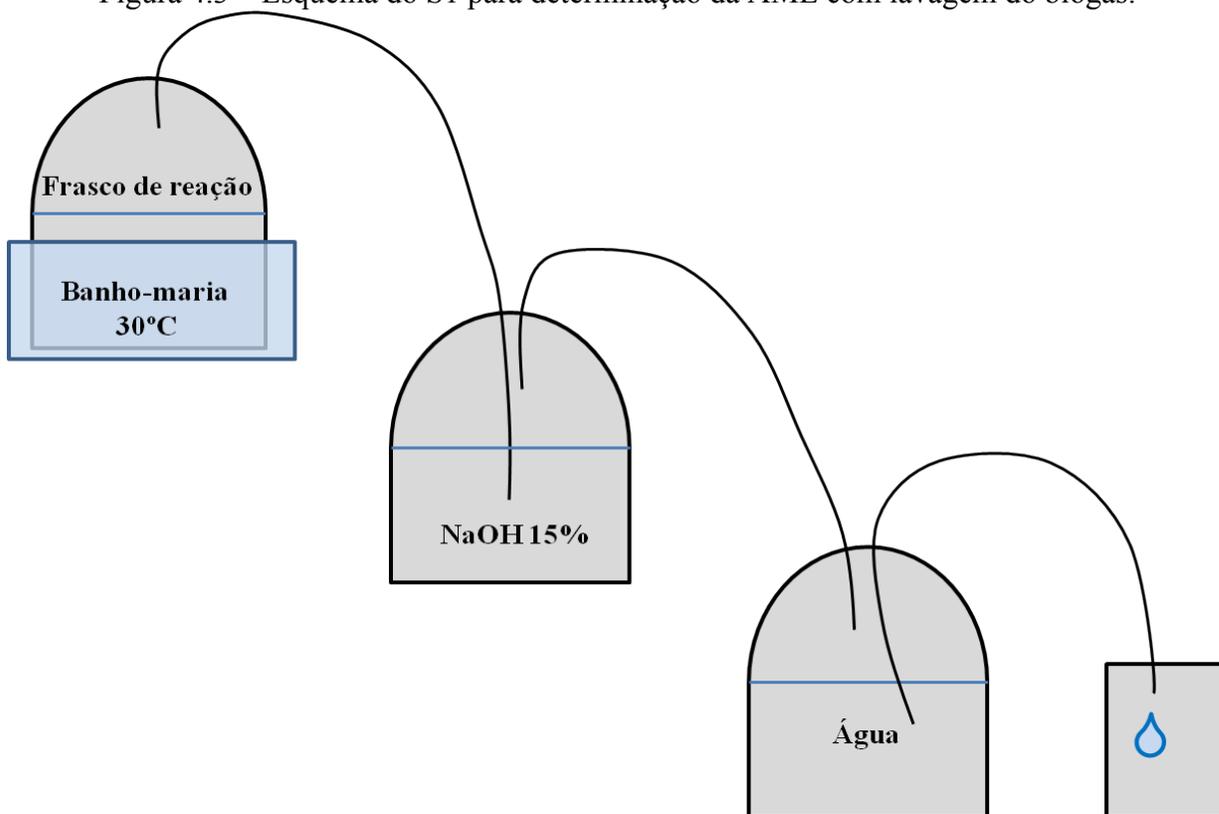
A medição do gás produzido foi feita diariamente até que não houvesse mais geração de gás. Elaborou-se um gráfico da produção acumulada de metano ao longo do tempo, a partir do qual determinou-se a AME, dada pela inclinação da reta tangente no ponto de inflexão da curva obtida, que corresponde ao coeficiente angular no trecho de maior inclinação do gráfico dividido pela quantidade de biomassa presente no frasco (concentração de STV). Este resultado corresponde à AME_1 (Atividade Metanogênica 1, em mL de CH_4 por grama de STV por dia), que foi convertida para g de DQO_{CH_4} , utilizando-se o fator de conversão estequiométrica ($F = 394$ mL de CH_4 por g de DQO , a $30^\circ C$ e 1 atm). Para isso, dividiu-se a AME_1 por F , obtendo-se a AME_2 , expressa em g $DQO_{CH_4}/gSTV.dia$.

4.2.3.1 Medição direta do volume de metano

Para este método, o biogás produzido foi lavado em solução de NaOH, a qual absorve o CO_2 e libera somente o metano. Realizou-se a montagem dos testes utilizando frascos tipo antibiótico com capacidade de 100 mL, sendo o frasco de reação composto por 80 mL de solução (lodo + substrato + nutrientes) e 20 mL de atmosfera interna (*headspace*). Este foi conectado por válvulas de três vias e mangueiras a um frasco de mesmo volume contendo 50 mL de NaOH 15% para lavagem do gás, seguido por outro frasco contendo água, para deslocamento do volume de metano produzido.

As conexões foram vedadas utilizando adesivo de silicone acético transparente, e o teste foi montado em triplicata com acetato, além de uma triplicata sem acetato como controle. Este foi denominado sistema 1 (S1 – Figura 4.3). Os frascos foram inoculados em banho-maria mantido na faixa de 30 a $32^\circ C$ e instalados com desnível, conforme Figura 4.3. No teste realizado com este sistema, apenas um dos frascos com acetato forneceu resultados, e os demais apresentaram problemas de vedação e conseqüente vazamento do gás produzido.

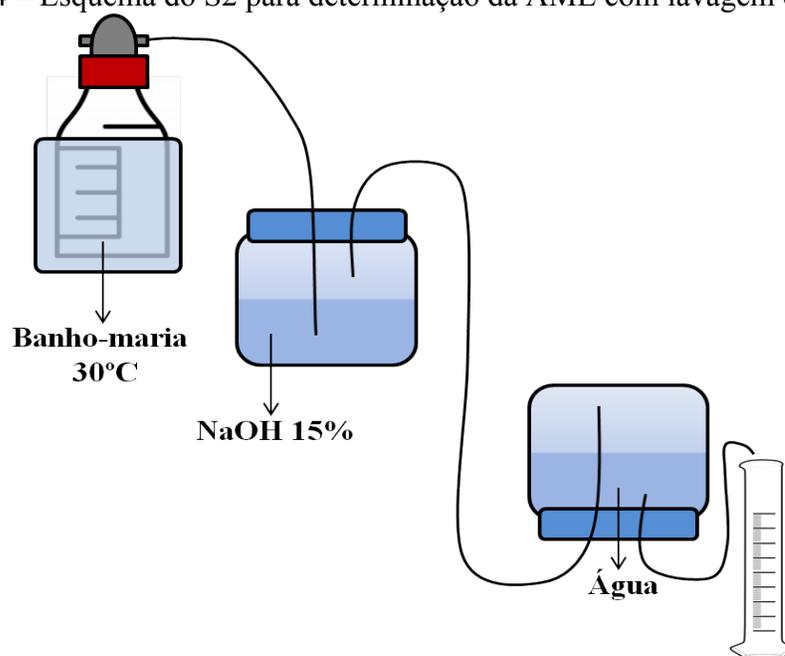
Figura 4.3 – Esquema do S1 para determinação da AME com lavagem do biogás.



Fonte: Do autor (2019).

Devido aos problemas encontrados nos sistemas utilizando os frascos tipo antibiótico com tampas de borracha, realizou-se a montagem de um sistema utilizando frasco Schott e tampa do tipo *trap* de gás para o frasco de reação, com lavagem do gás em NaOH 15% e deslocamento de água. Este segundo sistema, por se tratar de um volume maior e, portanto, maior representatividade amostral, foi montado em apenas um frasco, mantendo as mesmas concentrações e proporções de *headspace* (20%), lodo, substrato (acetato) e solução de nutrientes, sendo o volume total do frasco de 630 mL. Este foi denominado sistema 2 (S2 – Figura 4.4), no qual foram realizados três ensaios.

Figura 4.4 – Esquema do S2 para determinação da AME com lavagem do biogás.



Fonte: Do autor (2019).

4.2.3.2 Medição do volume e análise da composição do biogás

Os testes foram montados utilizando frascos tipo antibiótico com capacidade de 100 mL, composto por 80 mL de solução (lodo + substrato + nutrientes) e 20 mL de atmosfera interna (*headspace*), em triplicata com acetato, além de uma triplicata sem acetato como controle. Os frascos foram vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio, com o auxílio de alicate recravador, e inoculados em estufa incubadora a 30°C.

A medição do gás foi realizada diariamente com auxílio de seringa de vidro esmerilhada, que oferece resistência desprezível à entrada do gás, sendo possível a aferição do volume de gás produzido, e em seguida transferido para tubos vedados à vácuo com o auxílio de válvulas de três vias, e armazenado para análise em cromatografia gasosa. As coletas e análises do biogás gerado nos frascos foram realizadas até que não houvesse mais produção de gás, atingindo o máximo de produção acumulada de metano.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. Foi realizada leitura de curva padrão de metano, realizando a diluição do CH₄ padrão com 99,5% de pureza (White Martins) no mesmo tubo utilizado para o armazenamento das amostras de biogás com o

auxílio da seringa de vidro utilizada para injeção de gás no cromatógrafo.

A análise do teor de metano presente no biogás foi realizada por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC-2010 Shimadzu), sendo que o método do metano empregado teve como parâmetros: isotérmico = 50°C; tempo total do método = 5 min; temperatura do injetor = 200°C; temperatura do detector = 200°C; volume injetado = 0,5 mL; split 1:5; velocidade linear = 50 cm s⁻¹; fluxo da coluna = 3 mL min⁻¹; coluna RT-QPlot 30 m x 0,32 mm x 10 µm (divinilbenzeno); gás de arraste = He.

Os valores da área do pico obtidos para as amostras foram convertidos em concentração de metano (%) utilizando a curva padrão obtida, que, multiplicada pelo volume medido de biogás, fornece o volume de metano produzido, o qual foi utilizado para gerar o gráfico de produção acumulada de metano e cálculo da AME, conforme descrito anteriormente.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização da biomassa presente nos reatores UASB

A análise preliminar dos reatores mostrou que existe diferença quanto à concentração de biomassa entre os reatores, sendo que o reator B apresentou a maior concentração de STV, tendo sido o selecionado para a realização dos ensaios de AME. O levantamento do perfil de sólidos está apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Levantamento de ST e STV para cada reator UASB da ETE-UFLA.

Altura ¹	Reator											
	A		B		C		D		E		F	
	ST	STV	ST	STV	ST	STV	ST	STV	ST	STV	ST	STV
1	136,62	42,28	130,79	53,55	152,84	63,38	123,61	51,52	130,08	50,07	119,91	50,97
2	114,16	41,19	104,7	43,43	131,69	55,31	109,49	47,01	123,25	46,59	114,01	47,61
3	2,53	1,08	86,93	36,1	62,78	25,66	18,5	7,92	52,54	20,87	63,04	27,39
4	5,97	2,73	7,06	2,73	3,68	1,45	7	3,04	3,42	1,24	5,06	2,2
5	0,65	0,16	2,08	0,75	0,99	0,3	0,94	0,32	1,29	0,53	9,13	4,21
AC ²	51,67	18,47	64,97	26,33	53,61	21,78	48,1	21,5	56,76	24,8	58,26	24,22

¹ Altura de coleta da amostra, de acordo com a Figura 1, do fundo para o topo do reator; ² Amostra composta; ST = Sólidos totais; STV = Sólidos totais voláteis. Valores dados em g L⁻¹.

4.3.2 Atividade Metanogênica Específica por medição direta do volume de metano

Os resultados obtidos para os ensaios de AME estão apresentados na Tabela 4.4. O primeiro ensaio foi realizado no sistema com os frascos tipo antibiótico (S1), enquanto os demais foram realizados no sistema único com frasco Schott (S2). Os gráficos de produção acumulada de metano obtidos estão apresentados na Figura 4.5.

O primeiro teste, realizado no sistema 1, apresentou resultado inferior aos demais. Como dentre os seis frascos inoculados apenas um forneceu resultado, supõe-se que este também pode ter apresentado vazamentos de gás na montagem do experimento, afetando as medições de metano produzido.

Tabela 4.4 – Resultados de atividade metanogênica específica (AME) obtidos.

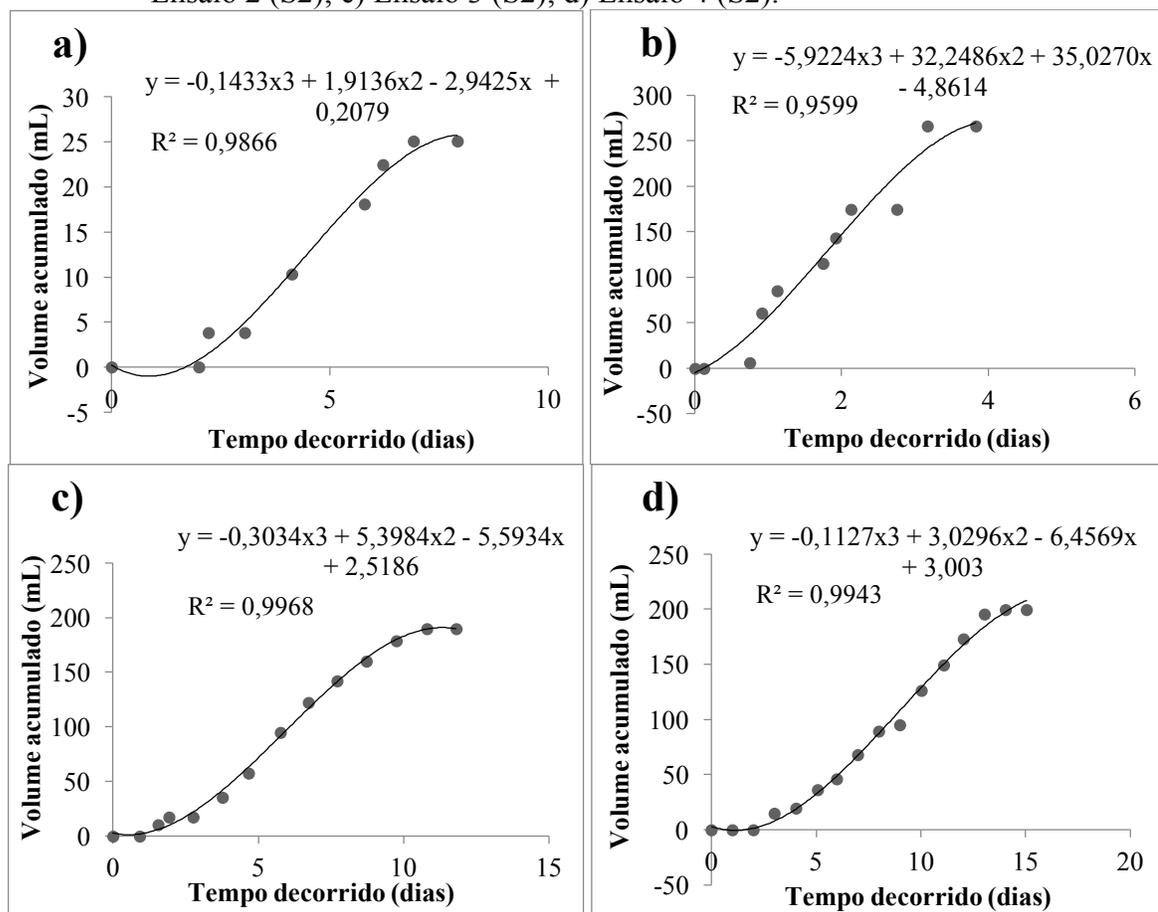
Ensaio	STV do lodo (g/L)	pH	AME ₁ (mL CH ₄ /gSTV.d)	AME ₂ (gDQO _{CH4} /gSTV.dia)
1	43,36	6,5	1,28	0,0033
2	44,75	6,7	21,56	0,055
3	35,11	6,6	6,09	0,0155
4	44,75	6,8	4,77	0,0121

Ensaio 1 realizado no sistema S1 (em frascos tipo antibiótico); ensaios 2 a 4 realizado no sistema S2 (reator único em frasco Schott).

Conforme observado na Tabela 4.4, houve uma redução na concentração de biomassa (STV) e na atividade metanogênica específica entre os testes 2 e 3. De acordo com os operadores da ETE, neste período foi realizada a substituição da bomba de uma das elevatórias de esgoto, e a mesma foi instalada com potência e vazão muito superiores à que era anteriormente utilizada. Por isto, além de fazer transbordar a área do gradeamento e calha Parshall da ETE quando as bombas eram ativadas, estava ocorrendo o carreamento de sólidos dos reatores por conta da maior velocidade de subida do esgoto dentro dos mesmos, sendo observada inclusive maior concentração de sólidos no efluente.

No teste 4 a concentração de STV voltou a subir, porém a AME manteve-se baixa. As diferenças observadas entre os testes podem ser atribuídas, portanto, à perda de biomassa do reator no período de análise. Porém, mudanças na AME durante o monitoramento de reatores podem indicar também processos de inibição da biomassa ou acumulação de matéria orgânica de difícil degradação ou até não-biodegradável (HUSSAIN; DUBEY, 2017).

Figura 4.5 – Produção acumulada de metano dos ensaios de AME para: a) Ensaio 1 (S1); b) Ensaio 2 (S2); c) Ensaio 3 (S2); d) Ensaio 4 (S2).



Avaliando, portanto, o maior resultado de AME obtido, de 0,055 gDQO_{CH4}/gSTV.dia, observa-se que este valor está abaixo dos reportados na literatura, sendo que valores usuais para AME de lodo tratando esgoto doméstico estão na faixa de 0,1 a 0,4 gDQO_{CH4}/gSTV.d (CHERNICHARO, 2007). Rocha et al. (2001) obtiveram resultados da ordem de 0,21 gDQO_{CH4}/gSSV.d para lodo tratando esgoto doméstico, 1,26 gDQO_{CH4}/gSSV.d para lodo tratando efluente de cervejaria e 1,20 gDQO_{CH4}/gSSV.d para lodo tratando efluente de indústria alimentícia de processamento de milho, todos utilizando acetato de sódio como substrato a 30°C. Zhang et al. (2018) avaliaram um reator UASB em escala piloto operando na faixa de 10 – 20°C e utilizaram a AME como um dos parâmetros de monitoramento, sendo observados valores de 0,24 a 0,27 gDQO_{CH4}/gSSV.d.

Álvarez et al. (2004) avaliaram a atividade metanogênica específica no monitoramento de um reator UASB tratando esgoto doméstico operado a 15°C acoplado a um digestor a 35°C, com

recirculação de lodo do UASB para o digestor, no período de *start-up*. A AME foi determinada utilizando ácido acético a 1 g L^{-1} como substrato e concentração de biomassa de 4 g SSV L^{-1} , e a temperaturas de 20°C e 35°C . A AME do lodo do reator UASB subiu de $0,042 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSSV.d}$ com 43 dias de operação para $0,047 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSSV.d}$ com 128 dias de operação a 20°C , e de $0,055$ para $0,079 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSSV.d}$ a 35°C .

Braga et al. (2017) utilizaram ensaios de AME para avaliar o efeito da presença ou ausência de alguns metais, que atuam como micronutrientes, na atividade da biomassa anaeróbia de seis reatores UASB em ETEs de diferentes cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Metais-traço estão envolvidos na atividade enzimática microbiana, existindo valores ótimos e limitantes de concentração para cada tipo de metal e de microrganismo. Os ensaios foram realizados utilizando $1,24 \text{ g L}^{-1}$ de STV, 1 g L^{-1} de ácido acético como substrato e com solução de macronutrientes, porém sem adição de micronutrientes (metais-traço) para que os mesmos fossem fornecidos apenas pelos já existentes no lodo. Os autores encontraram valores de AME que variaram de $0,033$ a $0,103 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSTV.d}$, sendo o menor valor de AME observado no reator que apresentou concentração de cobre (Cu) significativamente maior que nos demais, apesar de, conforme apontado pelos autores, diferenças na AME não podem ser atribuídas diretamente às concentrações de metais sem considerar outros fatores, como adaptação ao substrato e composição do inóculo (BRAGA et al., 2017).

Lucena et al. (2011) avaliaram a AME de um reator UASB de uma ETE de Recife tratando esgoto doméstico, estudando separadamente as diferentes alturas da manta de lodo do reator. Os autores utilizaram ácidos acético, propiônico e butírico como substratos, soluções de macro e micronutrientes e concentração de biomassa de 5 g SSV L^{-1} . Os resultados demonstraram que existe certa diferença entre as amostras das diferentes alturas da manta de lodo, sendo que a AME reduziu de $0,37 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSSV.d}$ no fundo do reator para $0,29 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSSV.d}$ para a maior altura amostrada.

Pelo fato de a ETE estudada tratar os efluentes líquidos de uma universidade, onde as mais diversas pesquisas e experimentos são realizados diariamente, é possível que parte dos efluentes químicos e/ou biológicos gerados possam afetar o sistema de tratamento. A universidade conta com coleta e tratamento específicos para estes efluentes, porém é responsabilidade de cada usuário dos laboratórios e dependências da universidade de realizar a separação e o acondicionamento adequado dos mesmos para que possam receber a destinação

correta. Dessa forma, eventualmente pode ocorrer o lançamento de produtos químicos na rede de esgoto, levando à alterações na comunidade microbiana dos reatores e adaptação da mesma ao efluente sendo tratado. Nos ensaios de AME, o lodo é submetido a um substrato que pode diferir das características do esgoto à qual a biomassa está adaptada, resultado em baixos valores de AME.

Alves, Cammarota e França (2005) avaliaram a inibição da biomassa anaeróbia por substâncias presentes em efluentes de laboratório de pesquisa, utilizando lodo de reator UASB de uma indústria alimentícia e solução de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico e butírico) como substrato e observaram que sódio, cromo, fenol e sulfato, além das interações sulfato-mercúrio e sulfato-sódio apresentaram os maiores efeitos sobre o percentual de inibição da AME.

O acúmulo de ácidos graxos (ácidos orgânicos de cadeia longa), produtos da hidrólise de lipídios, comum em reatores tratando efluentes ricos em lipídio, também é um fator que pode inibir a atividade dos microrganismos hidrolíticos, acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos. Porém, arqueias apresentam maior tolerância ao acúmulo de ácidos graxos do que as bactérias, sendo que arqueias metanogênicas hidrogenotróficas são mais resistentes à toxicidade por estes compostos do que as acetoclásticas (KOUGIAS et al., 2016).

Vale ressaltar que a maioria dos valores de AME da literatura discutidos utilizam sólidos suspensos voláteis (SSV) como estimativa de biomassa, e somente o estudo realizado por Braga et al. (2017) utilizou sólidos totais voláteis (STV) assim como no presente estudo e conforme a metodologia aqui empregada descrita por Abreu e Araújo (2011). Este fator deve ser considerado na comparação de resultados, visto que pode causar diferenças no cálculo final da AME e apresentar valores menores do que os que poderiam ser obtidos utilizando SSV.

Além disso, os ensaios realizados neste trabalho utilizaram somente acetato de sódio como substrato para metanogênese, sendo quantificada, portanto, a atividade de arqueias metanogênicas acetoclásticas, já que, de modo geral, cerca de 70% do metano oriundo do tratamento anaeróbio de esgoto vem do acetato (CHERNICHARO, 2007). Porém, em alguns casos, inclusive em situações de estresse na operação dos reatores, arqueias hidrogenotróficas podem passar a ser predominantes na biomassa anaeróbia (VENKITESHWARAN et al., 2017; AMHA et al., 2018) e ultrapassar a atividade acetoclástica na produção de metano, sendo também uma possibilidade para explicar os resultados de AME para o lodo analisado.

Ao analisar as dimensões do reator UASB (Figura 4.2) juntamente com a vazão de projeto

dos mesmos, de $150 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$, tem-se um TDH de projeto de aproximadamente 10 horas. No entanto, com a vazão sendo tratada na ETE atualmente (cerca de $200 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$), o sistema está operando com um TDH de 1,87 dias, reduzindo a carga orgânica aplicada, o que também pode estar afetando a atividade da biomassa e reduzindo a AME do lodo, conforme os resultados obtidos por Paula (2007), que observou aumento da AME de 0,1 para $0,37 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSSV.d}$ ao reduzir o TDH de um reator UASB tratando esgoto doméstico de 9 para 5 horas.

O resultado de AME fornece quanto de DQO foi convertida em CH_4 por grama de STV por dia. Assim, analisando esse resultado, é possível estimar a carga orgânica que pode ser aplicada ao reator a fim de evitar um desequilíbrio da digestão anaeróbia (AQUINO et al. 2007). Desta forma, considerando o resultado de $0,055 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSTV.d}$, a concentração de STV obtida na coleta do lodo utilizado neste teste ($44,75 \text{ gSTV L}^{-1}$), e as dimensões do reator apresentadas na Figura 4.2, calculou-se a estimativa da quantidade total de biomassa no reator e sua capacidade de conversão de DQO em metano, resultando em uma carga orgânica máxima de $117,2 \text{ kg DQO d}^{-1}$ por reator UASB, equivalente a $2,46 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (cálculos considerando o volume da manta de lodo até a altura do ponto de coleta logo acima dos defletores – Figura 4.2), valor próximo da carga orgânica volumétrica usualmente considerada no projeto de reatores UASB para esgoto sanitário, na faixa de $2,5$ a $3,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (CHERNICHARO, 2007). Além disso, considerando a AME_1 deste mesmo ensaio, de $21,56 \text{ mL CH}_4/\text{gSTV.d}$, multiplicada pela quantidade total de biomassa no reator, tem-se que cada reator tem capacidade de gerar $45,96 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ de CH_4 .

4.3.3 Atividade Metanogênica Específica por medição do volume e análise da composição do biogás em Cromatografia Gasosa

Os resultados obtidos para o ensaio de AME realizado em frascos tipo antibiótico e quantificação do metano por meio da análise da composição do biogás estão apresentados na Tabela 4.5, para os frascos com substrato (acetato de sódio). Os frascos sem substrato (controle) resultaram em valores próximos de zero (na faixa de $10^{-5} \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSTV.d}$), como esperado, e não estão apresentados. Este ensaio foi realizado concomitantemente com o segundo ensaio do sistema S2 (Ensaio 3) com medição direta de metano, na tentativa de visualizar uma relação entre as duas formas de quantificação do metano.

Tabela 4.5 – Resultados de atividade metanogênica específica (AME) obtidos por análise do biogás.

Ensaio	AME ₁ (mL CH ₄ /gSTV.d)	AME ₂ (gDQO _{CH4} /gSTV.dia)
	0,3978	0,0010
Com acetato	0,4242	0,0011
	0,3929	0,0010
Média	0,4050	0,0010

Conforme observado, os valores obtidos por este método foram 55 vezes menores que o melhor resultado discutido no item 3.2. Isso ocorreu devido à forma de transferência do biogás coletado dos frascos de reação para os tubos utilizados para o armazenamento e transporte das amostras. Devem ser utilizados tubos vedados à vácuo do tipo utilizado para coleta de sangue. Porém, pela indisponibilidade de frascos novos lacrados de fábrica para cada amostra, os frascos foram reutilizados. Para isso, utilizou-se de seringa de plástico com válvula de três vias e agulha para remover “todo” o ar de dentro do frasco, sendo o biogás coletado posteriormente injetado no mesmo, que era então fechado com duas camadas de plástico filme e fitas adesivas. Os tubos eram armazenados por até três dias e transportados até o laboratório onde as análises de cromatografia foram realizadas.

Neste processo, observou-se que, mesmo retirando ar de dentro do tubo diversas vezes, não era possível remover por completo todo o gás do mesmo. Ao retirar a agulha da tampa e vedar o tubo com o plástico filme ocorria a entrada de ar atmosférico, já que o tubo tinha volume de 10 mL e as amostras apresentavam volumes menores (de 0,1 a 7,6 mL). Além disso, não se sabe da eficiência de vedação de gás das seringas e válvulas utilizadas no processo. Todos esses fatores podem ter afetado a coleta e amostragem do biogás, levando à diluição do mesmo e perda de metano. Por este motivo, os resultados obtidos por cromatografia foram desconsiderados.

4.4 Conclusão

Observou-se que os valores de AME para o lodo de UASB estudado encontram-se abaixo dos comumente reportados na literatura, com ressalvas em relação à unidade de estimativa de biomassa utilizada para comparação dos resultados. Observou-se também que, uma perturbação operacional da ETE, resultou em alteração significativa da AME, demonstrando o potencial deste

ensaio como parâmetro de monitoramento de sistemas anaeróbios. Os baixos valores de AME obtidos podem ser ocasionados por eventuais lançamentos de efluentes químicos na rede de esgoto da universidade, e pela utilização somente de acetato de sódio como substrato, subestimando a participação das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas na geração de metano. Apesar dos valores relativamente baixos de AME, cada reator UASB da ETE teria capacidade de converter 117 kgDQO d⁻¹ em CH₄, produzindo quase 46 m³ d⁻¹ de gás metano. Sugere-se a implementação do monitoramento da estação de tratamento de esgoto por meio de ensaios periódicos de AME com lavagem do biogás em solução de hidróxido de sódio, por apresentar menor custo e possibilitar a obtenção de resultados satisfatórios, bem como um melhor entendimento do sistema.

Referências

- ABREU, E. F. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário**. 2007. 93 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ABREU, E. F.; ARAÚJO, J. C. Ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) para Lodos Anaeróbios. **Procedimento Operacional Padrão**. 27 p. Belo Horizonte : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental / UFMG, 2011.
- ÁLVAREZ, J. A. et al. Performance of a UASB-Digester system treating domestic wastewater. **Environmental Technology**, v. 25, p. 1189-1199, 2004.
- ALVES, L. C.; CAMMAROTA, M. C.; FRANÇA, F. P. Inibição de lodo biológico anaeróbio por constituintes de efluente de laboratório de controle de poluição. **Eng. sanit. ambient.** v. 10, n. 3, p. 236-242, 2005.
- AMHA, Y. M. et al. Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 999-1014, 2018.
- APHA, AWWA e WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, D.C. : American Public Health Association, 2005.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em lodos anaeróbios. **Eng. Sanit. ambient.** v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007.
- BARROS, A. R. M. et al. Acompanhamento da partida de reator UASB através da atividade metanogênica específica – AME. In: V Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação – CONNEPI 2010, **Anais...**, Maceió, 2010.

BRAGA, A. F. M. et al. Metal fractionation in sludge from sewage UASB treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p. 98-107, 2017.

CAMPOS, J. R. (Coord.). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Projeto PROSAB. 464 p. Rio de Janeiro : ABES, 1999.

CHERNICHARO, C. A. L. et al. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v. 114, p. 649-679, 2015.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Vol. 5 – Reatores Anaeróbios**. 246 p. Belo Horizonte : UFMG, 2007.

FIALHO, D. E. S. **Hormônios estrógenos em estação de tratamento de esgoto: sistema combinado UASB e FBAS**, Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologias e Inovações Ambientais – em andamento), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

HUSSAIN, A.; DUBEY, S. K. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. **Applied Water Science**, v. 7, p. 535-542, 2017.

KHAN, A. A. et al. Sustainable options of post treatment of UASB effluent treating sewage: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 55, p. 1232-1251, 2011.

KOUGIAS, P. G. et al. Dynamic functional characterization and phylogenetic changes due to Long Chain Fatty Acids pulses in biogas reactors. **Nature Science Report** v. 6, n. 28810, 2016.

LECKER, B. et al. Biological hydrogen methanation – A review. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1220-1228, 2017.

LUCENA, R. M. et al. Study of the microbial diversity in a full-scale UASB reactor treating domestic wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2893-2902, 2011.

MATOS, M. P. et al. Estimativa da produção e perdas de metano por diferentes modelos em reator UASB da ETE-UFLA. In: 30º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, **Anais de Congresso**, Natal/RN, 2019.

METCALF, L.; EDDY, H. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4 ed. Revisado por George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. David Stensel. New York : McGraw-Hill, 2003.

PAULA, de. F. S. **Influência de aspectos hidráulicos na otimização de parâmetros de projeto de reatores UASB tratando esgotos domésticos**. 2007. 126 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ROCHA, M. A. G. et al. Avaliação e comparação entre a atividade metanogênica específica de lodos de esgotos doméstico e industriais. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e

Ambiental, **Anais...**, João Pessoa/PB, 2001.

SOUTO, T. F. et al. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test, **Biodegradation**, v. 21, p. 411-424, 2010.

SOUZA, C. L. **Estudo das rotas de formação, transporte e consumo dos gases metano e sulfeto de hidrogênio resultantes do tratamento de esgoto doméstico em reatores UASB**. 2010. 127 p. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

TABATABAEI, M. et al. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments, **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1214-1225, 2010.

VASCO-CORREA, J. et al. Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1015-1026, 2018.

VENKITESHWARAN, K. et al. Correlating methane production to microbiota in anaerobic digesters fed synthetic wastewater. **Water Research**, v. 110, p. 161-169, 2017.

ZHANG, L. et al. Anaerobic treatment of raw domestic wastewater in a UASB-digester at 10°C and microbial community dynamics. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 2088-2097, 2018.

5 ARTIGO 2: ENRICHMENT OF METHANOGENIC MICROORGANISMS FROM SLUDGE OF A SEWAGE TREATMENT PLANT

ABSTRACT

Anaerobic digestion is a process that relies on a balanced interaction between different groups of microorganisms that comprise an anaerobic biomass, each group responsible for a step, depending mainly on acidogenic and acetogenic bacteria and methanogenic archaea. Methanogenic archaea can be divided in acetoclastic, which produce methane from acetate, and hydrogenotrophic, which produce methane mainly from CO₂ and H₂. Regarding the relevance of understanding the microbiology involved in anaerobic digestion in order to provide better control of biological processes, this study aimed to investigate the community composition in the sludge of a UASB reactor in operation at UFLA's WWTP since 2016. It was also intended to cultivate methanogenic biomass from this sludge, specifically acetoclastic methanogenic archaea, using a bench scale reactor, providing optimum conditions for their growth, such as nutrients, substrate and temperature control. The sludge was cultivated using Zinder basal medium and sodium acetate as carbon source for 70 days. Samples of inoculum and enriched sludge were sequenced in the New Generation Illumina MiSeq platform. Results showed that the inoculum had higher abundance of the hydrogenotrophic methanogen *Methanobacterium* (3.89%), followed by the acetoclastic *Methanosaeta* (0.12%). After cultivation, *Methanosaeta* increased in abundance from 0.12% to 1.37%, indicating that the method was effective for cultivating acetoclastic methanogenic archaea.

Keywords: Anaerobic Sludge. Methanogenic Archaeas. UASB Reactor.

5.1 Introduction

Anaerobic digestion is the conversion of complex organic matter in simpler products, primarily methane and carbon dioxide, in an environment lacking molecular oxygen, through sequential steps, producing new bacterial cells. This process depends on three main specialized microorganisms groups: fermentative bacteria (acidogenic), syntrophic bacteria (acetogenic) and methanogenic archaea (TABATABAEI et al., 2010). The treatment of wastewater through anaerobic digestion has several advantages, including the generation of an energy source, the biogas, it does not require energy for aeration, and lower costs for sludge treatment (BANDARA et al., 2012).

Methanogenesis, the final step of anaerobic digestion, is performed by methanogenic

archaea. In terms of affinity for substrate, they can be divided into two main groups: acetoclastic, which produce methane from acetate; and hydrogenotrophic, which produce methane reducing CO_2 with H_2 as the electron donor. In general, about 70% of methane produced in anaerobic systems come from the degradation of acetate by acetoclastic archaeas (AYDIN et al., 2015). Hydrogenotrophic archaea are represented by five orders, where almost all the species reduce CO_2 to CH_4 with H_2 as the main electron donor. Acetoclastic and methylotrophic archaea are represented by the order *Methanosarcinales*, producing CH_4 from a variety of methyl compounds or methyl group from acetate (COSTA; LEIGH, 2014). Methanogenic archaea from classes *Methanomicrobia* and *Methanobacteria* are the main hydrogenotrophic and acetoclastic, respectively, found in methanogenic sludges (KURODA et al., 2014).

Understanding the microbiology involved in anaerobic digestion is essential to reach the advantages of this method of treatment (TABATABAEI et al., 2010). Studying the structure and equilibrium between microorganisms from this biomass allows the understanding of the potential and limitations of the system, serving as a warning about inhibitory factors that may compromise the process (ANTWI et al., 2017). However, much remains unknown about the diversity and importance of microorganisms, justifying the interest in expanding studies of anaerobic reactors in order to seek further information to support improvements in their performance, specially in cases of wastewater with non-domestic characteristics.

The composition and diversity of the anaerobic biomass can affect hydrolytic and methanogenic activity, meaning that different microbial population can show different anaerobic digestion efficiencies, which can also be altered by microbial adaptation. This can lead to a lower diversity but a more specified biomass. One way of reaching this is through selective population enrichment (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2018).

The sewage treatment plant at Federal University of Lavras (UFLA) applies anaerobic digestion in UASB reactors as part of the treatment. Since the sewage produced in the university usually presents distinct characteristics if compared with usual domestic sewage, and the reactors' start-up process did not use inoculum, this study intended to investigate the community composition in the sludge of a UASB reactor in operation at UFLA's WWTP since 2016, as well as cultivate methanogenic biomass from this sludge, specifically acetoclastic methanogenic archaea, using a bench scale reactor, providing the adequate nutrients, substrate and environmental conditions.

5.2 Material and Methods

5.2.1 Sewage treatment plant, sampling and selection of the UASB reactor for the study

The sludge was collected from a UASB reactor operating at the wastewater treatment plant (WWTP) from Federal University of Lavras (UFLA), in Lavras/MG-Brazil. The plant treats the sewage generated in the University, wherein chemical waste is stored and treated by a specific laboratory. The WWTP treats about 150 to 200 m³ of sanitary sewage per day in six UASB reactors, preceded by preliminary treatment and followed by aerated biological filters. The dimensions of each reactor is shown in Figure 5.1, where each one presents a volume of 62.3 m³ with a designed flow rate of up to 150 m³ per day. The sewage treated at the WWTP shows highly variable characteristics, with chemical oxygen demand (COD) around 847±652 mg L⁻¹ (MATOS, 2019), while usual values for typical sanitary sewage varies from 250 to 800 mg L⁻¹ (METCALF; EDDY, 2003).

The sludge samples were collected from all six UASB reactors at the five points available, as shown in Figure 5.1 by the red arrows. Total solids (TS) and total volatile solids (TVS) concentrations were analyzed for each sample, according to APHA, AWWA and WEF (2005), as well as for the composite sample of each reactor, obtained by mixing the same volume of each sample from all five points, in order to represent the entire reactor. This result was used to select the reactor with the highest biomass concentration for the experiment, estimated by the total volatile solids concentration. Temperature and pH were measured using pH meter mPA210 from MS TECNOPON.

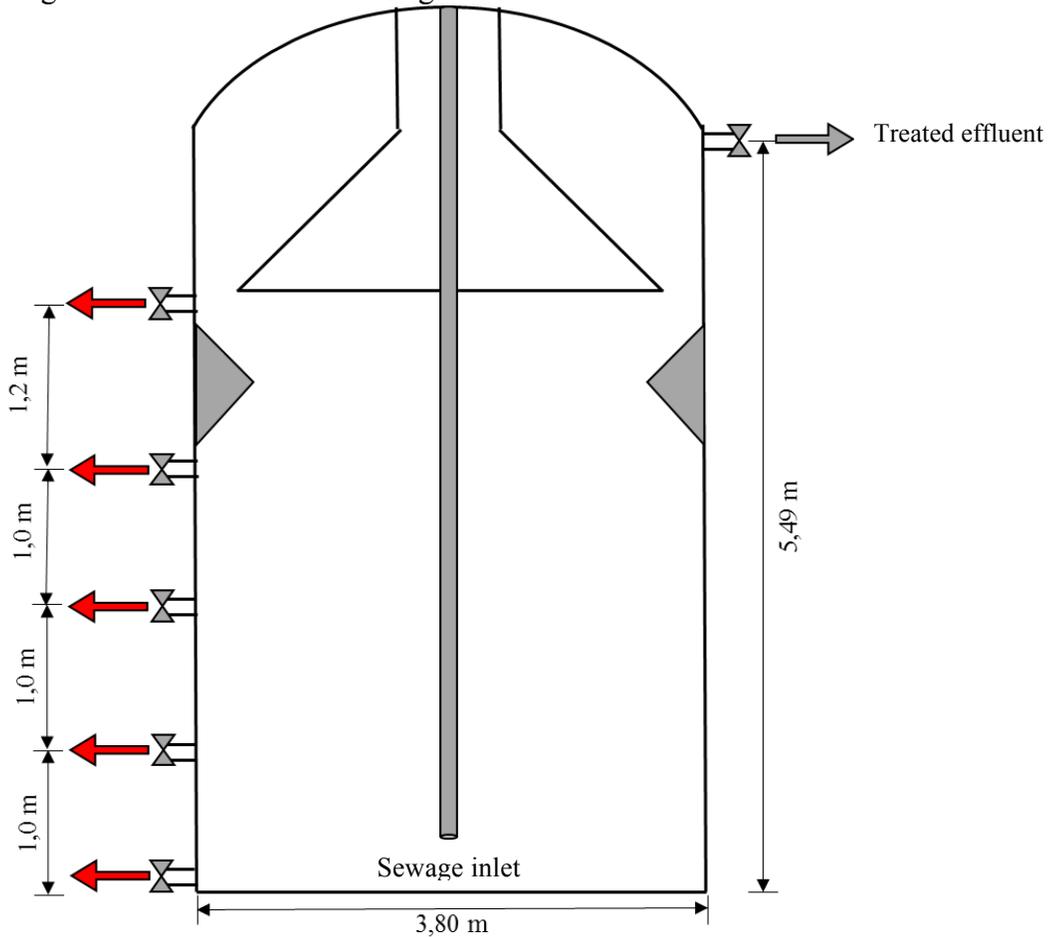
5.2.2 Reactor setting for biomass cultivation

The sludge was collected on 11/22/2018, temperature and pH were measured, and TS and TVS were analyzed. The reactor for cultivating anaerobic biomass was incubated on 11/29/2018, using Zinder basal medium, with sodium acetate as substrate, according to the methods presented by Sarti (2007), with adaptations. A sample of the inoculum was frozen for posterior molecular analysis.

The reactor had a total volume of 500 mL, and a volume of 30% (150 mL) was used as

headspace (Figure 5.2). The inoculum concentration in the reactor was 7% v/v and food/microorganism ratio was 0.2 kg DQO/kg STV.d, which was multiplied by 7 since the medium was changed once a week, operating as a batch reactor. The volume was completed with Zinder basal medium, with the concentrations shown on Table 5.1 and 5.2. Nitrogen (N₂ 99.99%) was pumped into the liquid and the headspace of the reactor for 20 minutes to remove oxygen and assure anaerobic conditions. A bag was connected to the top of the reactor for gas storage.

Figure 5.1 – Scheme of the design of the UASB reactors installed at ETE-UFLA.



Source: The author (2019).

Table 5.1 – Zinder basal medium composition.

Substance	Quantity (in 1 L solution)
NH ₄ Cl	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05 g
Metal-trace solution	10.0 mL

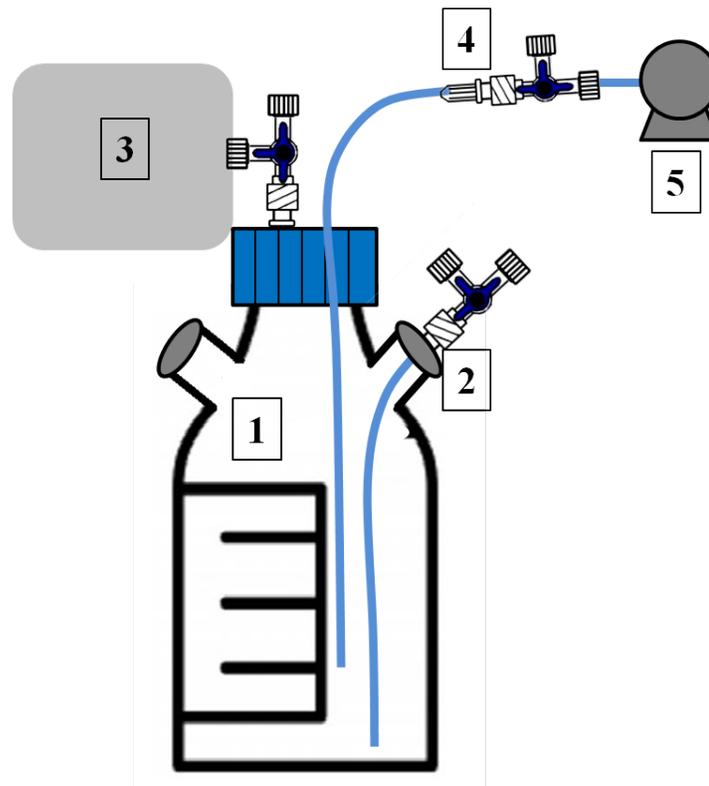
Source: Sarti (2007).

Table 5.2 – Metal-trace solution composition.

Substance	Quantity (in 1 L solution)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.556 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.086 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.21 g
H ₃ BO ₃	0.19 g
Na ₂ MoO ₄	0.01 g

Source: Sarti (2007).

Figure 5.2 – Reactor setting for anaerobic biomass enrichment.



1. 500 mL Schott flask; 2. Connection for sludge sampling; 3. Bag for produced gas storage; 4. Connection for removal and insertion of medium; 5. Peristaltic pump.

Source: The author (2019).

5.2.3 Reactor operation and monitoring

The reactor was sealed and operated for 70 days at 35°C in bacteriological incubator, without mixing, with a hydraulic retention time of 7 days. In order to feed the reactor, it was left settling until the sludge was primarily on the bottom, and a volume of approximately 290 mL of liquid from the top was pumped out, while another 290 mL of Zinder solution with the same

initial concentration of sodium acetate, flushed with nitrogen, was pumped in. The medium removed from the reactor was monitored by measuring temperature and pH.

5.2.4 Enriched sludge sampling and analysis

After 70 days, a sample of the enriched sludge was collected and sent for sequencing. The samples of inoculum and enriched sludge were sequenced by DSMA Desenvolvimento Sustentável e Monitoramento Ambiental, in Mogi das Cruzes/SP-Brazil. The rRNA was amplified to detect *Bacteria* and *Archaea*, and sequenced in New Generation Illumina MiSeq.

First, the DNA was extracted using DNeasy PowerSoil Kit – Qiagen according to manufacturer instructions, and quantified by Electrophoretic Running and Fluorimeter using Ultrapure Agarose Electrophoresis Quantus – Promega. The DNA was amplified with Polymerase Chain Reaction (PCR), with primers 515F-806R (518F: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA; 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT), specific for the V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene for Bacteria and Archaea domains. Sequencing reactions were subjected to initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds and final extension at 72°C for 5 minutes. The products were then purified and attached to adapters according to manufacturer's instructions.

The New Generation Sequencing (NGS) of 16S rRNA was performed in the MiSeq Platform, with bioinformatics analysis according to Caporaso et al. (2012). The sequences obtained were compared with the genetic database from SILVA (www.arb-silva.de). Diversity indices (Shannon, Simpson and Chaol) were calculated by QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) software, a next-generation microbiome bioinformatics platform.

5.3 Results and Discussion

5.3.1 Preliminary analysis and selection of the UASB reactor for the study

The preliminary sampling and analysis from all six reactors showed that there was a difference in biomass concentration between them, where reactor B presented the highest volatile

total solids concentration, hence being the one selected to be analyzed in the study. The solids profile analysis is shown in Table 5.3.

Table 5.3 – Total solids and total volatile solids analysis for each UASB reactor.

Height ¹	Reactor											
	A		B		C		D		E		F	
	TS	TVS	TS	TVS	TS	TVS	TS	TVS	TS	TVS	TS	TVS
1	136.62	42.28	130.79	53.55	152.84	63.38	123.61	51.52	130.08	50.07	119.91	50.97
2	114.16	41.19	104.7	43.43	131.69	55.31	109.49	47.01	123.25	46.59	114.01	47.61
3	2.53	1.08	86.93	36.1	62.78	25.66	18.5	7.92	52.54	20.87	63.04	27.39
4	5.97	2.73	7.06	2.73	3.68	1.45	7	3.04	3.42	1.24	5.06	2.2
5	0.65	0.16	2.08	0.75	0.99	0.3	0.94	0.32	1.29	0.53	9.13	4.21
C ²	51.67	18.47	64.97	26.33	53.61	21.78	48.1	21.5	56.76	24.8	58.26	24.22

¹ Height of sample collection, as shown in Figure 1, from bottom to top of the reactor; ² Composite sample, mixing all the five samples for each reactor; TS = Total solids; TVS = Total volatile solids. Values shown in g L⁻¹.

5.3.2 Reactor monitoring

The monitoring of the medium that was removed once a week from the reactor showed that the pH was maintained in the range of 7.2 – 8.0, concluding that the conditions were adequate for anaerobic digestion during the experiment, without acidification or high ammonia production that could affect biomass activity. No alkalinity addition was needed.

5.3.3 Biomass analysis

The extracted DNA evaluation and quantification with electrophoretic running and fluorimeter showed a concentration of genomic DNA of 53.7 mg/μL for the inoculum and 63.4 ng/μL for the enriched sludge, which are satisfactory for amplification and sequencing. A total of 507,844 reads of sequences were obtained, which 286,986 were from the inoculum sample and 220,858 were from the enriched sludge sample. The samples were treated and filtered with QIIME software. The diversity indices shown in Table 5.4 indicate a decrease in diversity from the inoculum to the enriched sludge after cultivation, as expected, since the objective was to select specific groups of microorganisms. Thus, the indices confirm that the 70 days cultivation was successful in selecting some groups of microorganisms.

Table 5.4 Comparison between diversity indices for the inoculum and the enriched sludge.

	Inoculum	Enriched sludge
Number of reads	286,986	220,858
Number of OTUs	794	546
Shannon (H')	4.38	3.45
Simpson (1/D)	0.85	0.68
Chao 1	800	579

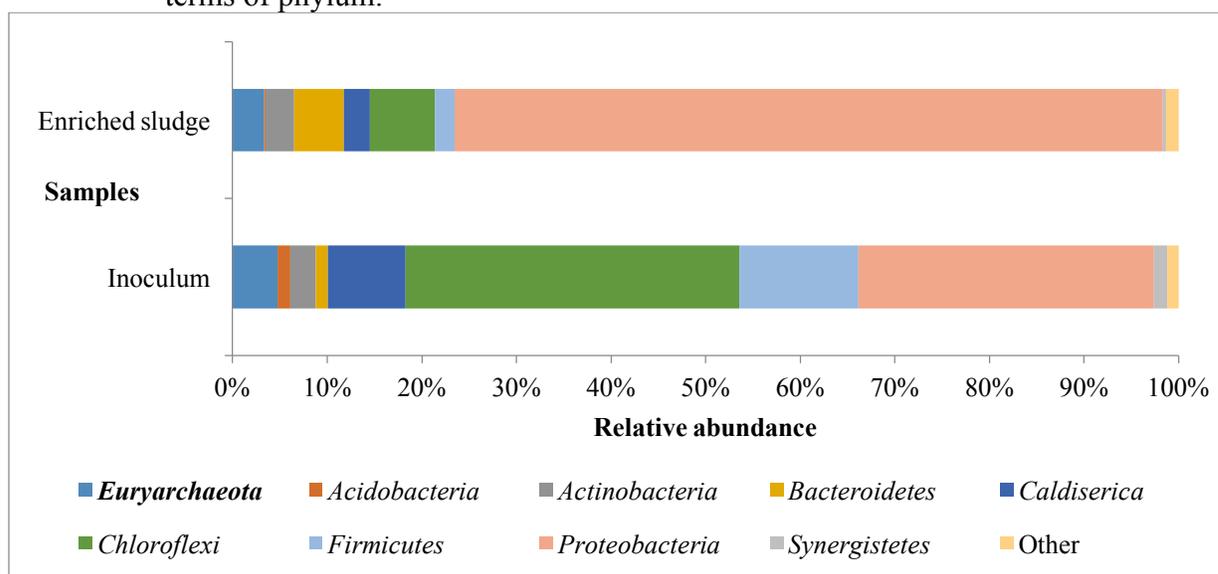
The data was analyzed in terms of phylum, order and genus, considering only the ones with relative abundance higher than 1%, and discussed by domain.

5.3.3.1 Phylum

One phylum from the *Archaea* domain and eight from the *Bacteria* domain were identified, as shown in Figure 5.3. *Euryarchaeota*, which contain all the methanogenic archaea, decreased from 4.77% in the inoculum to 3.36% in the enriched sludge.

Acidobacteria, *Caldiserica*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* and *Synergistetes* decreased in relative abundance from inoculum to enriched sludge, while *Actinobacteria* (2.66% to 2.98%), *Bacteroidetes* (1.33% to 5.25%) and *Proteobacteria* (31.25 to 74.84%) increased. The microbial community composition of the samples in terms of phylum is shown in Figure 5.3.

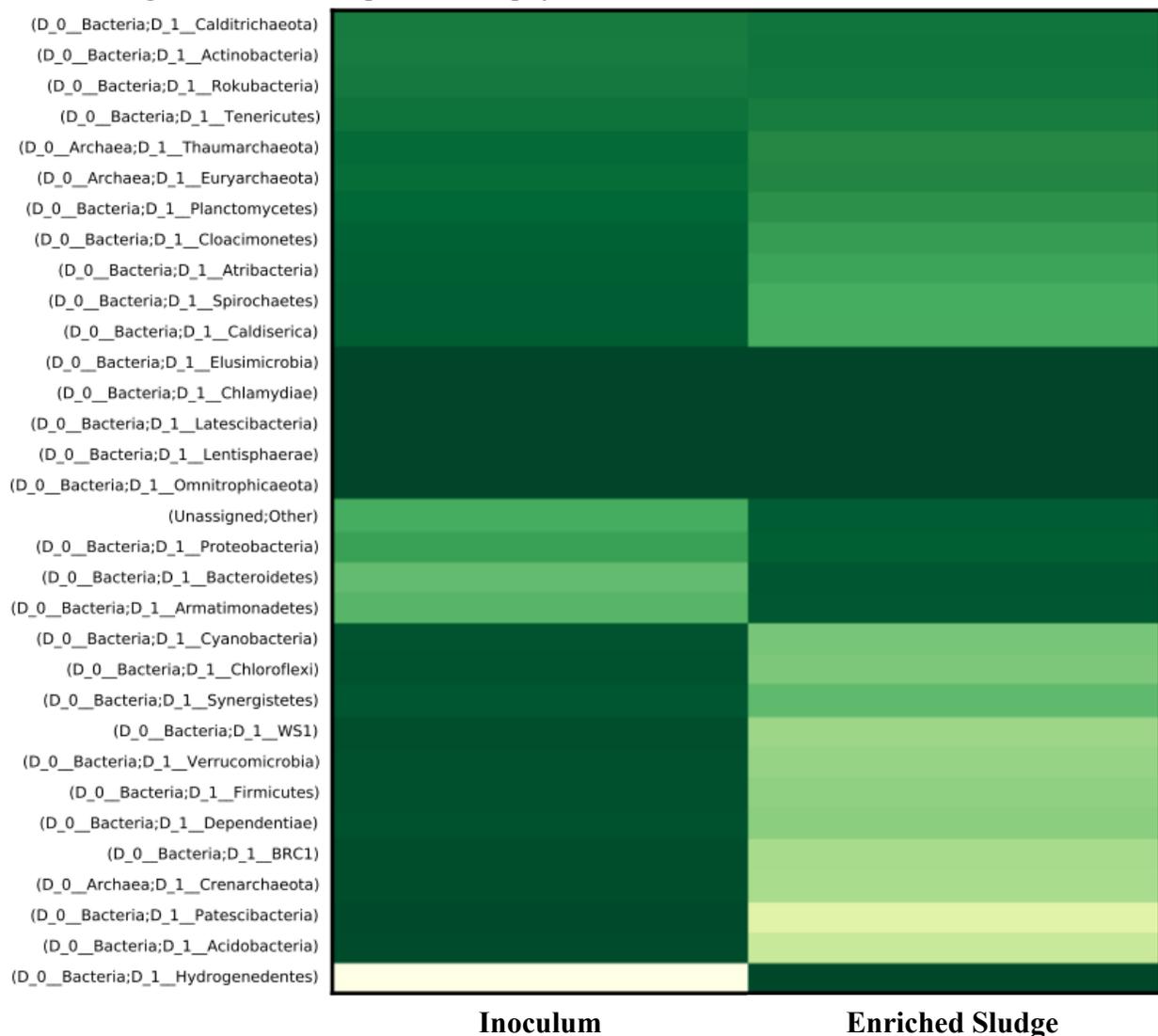
Figure 5.3 – Microbial community composition in inoculum and enriched sludge after 70 days in terms of phylum.



Source: The author (2019).

A heatmap was generated, using QIIME software, considering all phyla identified in both samples (phyla with less than 1% of relative abundance are also shown), comparing the community before and after cultivation (Figure 5.4). The graph illustrates the differences in diversity and composition between the two samples, representing higher abundance of an OTU in a more intense color, making it possible to visualize OTUs that increased, decreased and maintained abundance throughout the experiment by the difference in color intensity.

Figure 5.4 – Heatmap for all the phyla identified before and after cultivation.



5.3.3.2 Order

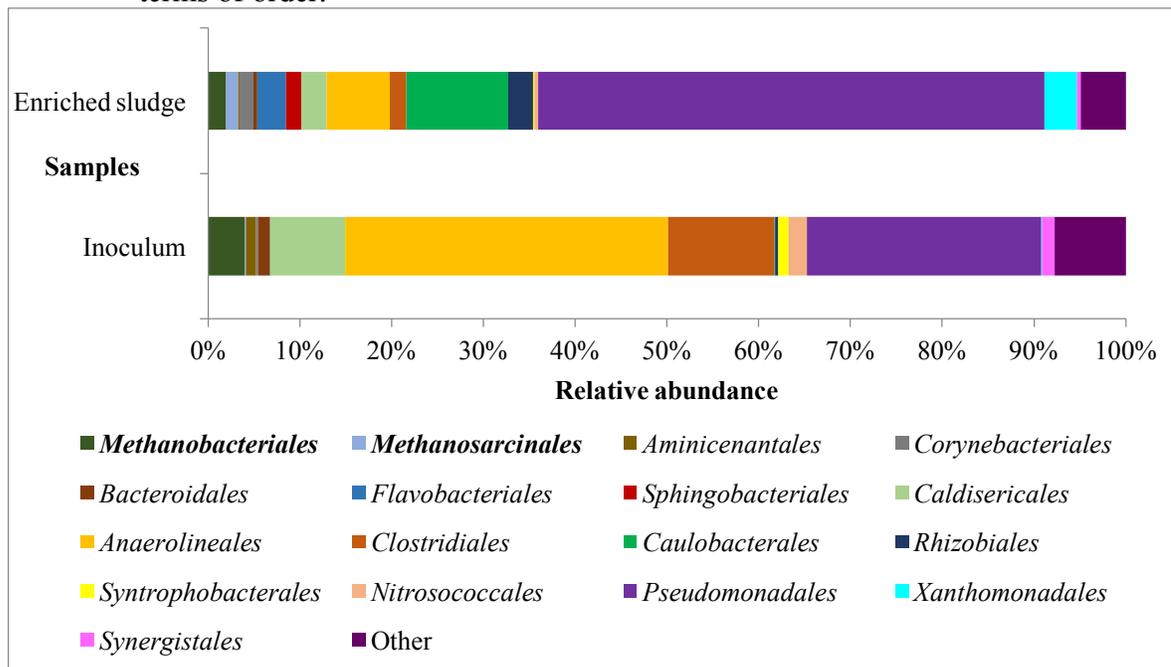
Two orders from *Euryarchaeota* were identified, *Methanobacteriales*, which decreased

from 3.98% in inoculum to 1.93% in enriched sludge, and *Methanosarcinales*, which increased from 0.14% to 1.38%.

Fifteen orders of bacteria were identified, where eight decreased in relative abundance. *Corynebacteriales*, from the phylum *Actinobacteria*, increased from 0.18% to 1.52%; *Flavobacteriales* and *Sphingobacteriales*, from *Bacteroidetes*, rose from 0.03% to 3.12% and 0.02% to 1.66%, respectively. From *Proteobacteria*, *Caulobacterales* went from 0.08% to 11.08%, *Rhizobiales* increased from 0.34% to 2.72%, *Pseudomonadales* rose from 25.54% to 55.18% and *Xanthomonadales* rose from 0.06% to 3.57%.

The microbial community composition in terms of order is shown in Figure 5.5.

Figure 5.5 – Microbial community composition in inoculum and enriched sludge after 70 days in terms of order.



Source: The author (2019).

5.3.3.3 Genus

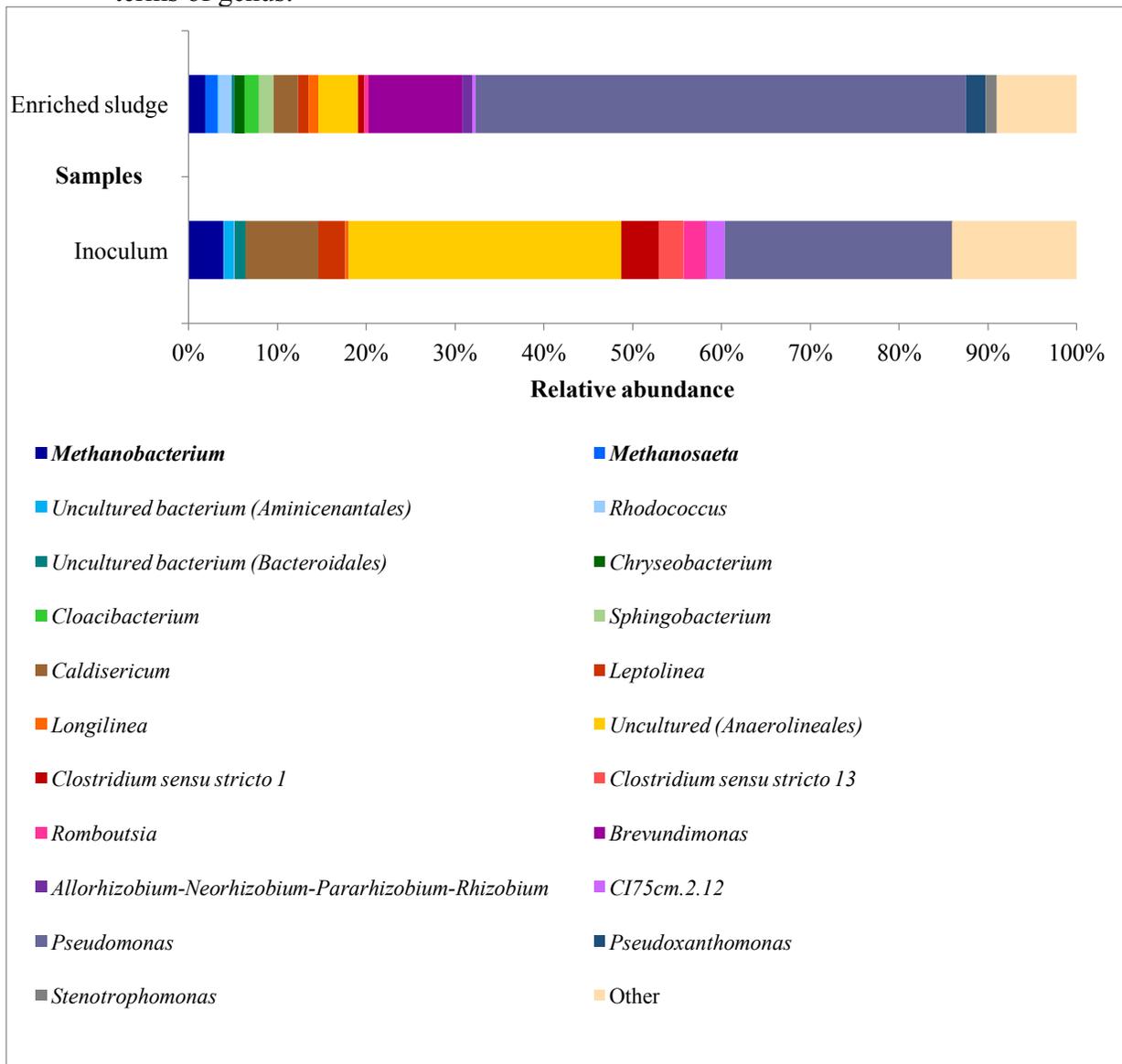
Two genera from *Euryarchaeota* were identified: *Methanobacterium*, that decreased from 3.89% to 1.92%, and *Methanosaeta*, which increased from 0.12% to 1.37%.

Nineteen genera of bacteria were identified, where three are uncultured microorganisms, including one from the order *Anaerolineales* that represented 30.7% of the sequences in the inoculum. The genus *Rhodococcus*, from the phylum *Actinobacteria*, increased from 0.03% in

the inoculum to 1.44% in the enriched sludge. From *Bacteroidetes*, three genera (*Chryseobacterium*, *Cloacibacterium* and *Sphingobacterium*) increased from ~0.01% to 1.12-1.64%. From *Proteobacteria*, five genera increased in abundance: *Brevundimonas*, from 0.07% to 10.55%; *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, from 0.05% to 1.13%; *Pseudomonas*, from 25.54% to 55.18%; *Pseudoxanthomonas*, from 0.02% to 2.27%; and *Stenotrophomonas*, from 0.01% to 1.2%.

The microbial community composition in terms of order is shown in Figure 5.6.

Figure 5.6 – Microbial community composition in inoculum and enriched sludge after 70 days in terms of genus.



Source: The author (2019).

5.3.4 Archaea domain

The inoculum from the UASB reactor showed 4.77% of abundance from archaea (phylum *Euryarchaeota*), higher than the ones found by Venkiteshwaran et al. (2017) when analyzing 50 different anaerobic sludges from both industrial and domestic wastewater treatment plants, and higher than most of the CSTR reactors codigesting mixtures of slaughterhouse, household and restaurant waste, crops, wheat silage and/or manure (0 – 7%) analyzed by Sundberg et al. (2013), but lower than the reactors treating sewage sludge (2 – 20%) studied by this same author.

The total abundance of the phylum *Euryarchaeota* reduced from 4.77% in the inoculum to 3.36% in the enriched sludge. On the level of genera, it can be observed that the highest abundance of archaea in the inoculums was from *Methanobacterium*, a hydrogenotrophic methanogen that reduce CO₂ to CH₄ with H₂ as electron donor, while some strains can also use formate, secondary alcohols and CO, with optimum growth temperatures of 37–45°C (GARRITY; HOLT, 2001).

Since the experiment had sodium acetate as the only substrate, the expected growth was for acetoclastic archaeas, which the only genus identified was *Methanosaeta* with an initial abundance of only 0.12%, increasing to 1.37% after cultivation. This genus uses only acetate as substrate, which is converted to methane and carbon dioxide, presenting optimum temperature for mesophilic strains of 35–40°C and optimum pH of 6.5–7.5 and can be isolated from anaerobic digestors treating domestic wastewater (GARRITY; HOLT, 2001). The large difference in abundance between these two genera suggests that hydrogenotrophic activity may be higher than acetoclastic in the UASB reactor.

Comparison of kinetics of acetate utilization indicate that *Methanosarcina* is favored at higher acetate concentrations, while lower concentrations would favor *Methanosaeta* (GARRITY; HOLT, 2001; CHERNICHARO, 2007), and *Methanosarcina* usually outcompetes *Methanosaeta* in digesters with high acetate concentration (>500 mg L⁻¹) (VENKITESHWARAN et al., 2017). This suggests that lower concentration of acetate occur in the UASB reactor, since *Methanosarcina* was not present in the sample.

Inhibition of acetoclastic methanogens can induce an increase in syntrophic acetate oxidizing bacteria, since they compete for substrate, which can increase, consequently, the hydrogenotrophic methanogenic activity. This SAO mechanism has yet to be more deeply studied

and understood, since there's little knowledge about which populations present this metabolism (AMHA et al., 2018). This process is not thermodynamically favorable under standard conditions, but can occur via syntrophic interaction between acetate-oxidizing bacteria and hydrogenotrophic archaea, and has been reported to be sustained under high temperature, salts, volatile fatty acids and ammonia conditions (LEE et al., 2015; MULLER et al., 2016).

Sundberg et al. (2013) analyzed the biomass from 21 CSTR anaerobic reactors, seven digesting sewage sludge and 14 codigesting various wastes from slaughterhouses, restaurants, households, etc., and found that six of the reactors fed with sewage had dominance of *Methanosaeta* and only one had the dominance of the hydrogenotrophic *Methanobrevibacter*, while all the codigestion reactors had hydrogenotrophic archaeas as the most abundant. The sewage fed reactor with hydrogenotrophic archaea dominance operated with significantly higher hydraulic retention time than the others, condition necessary for the growth of microorganisms that act in syntrophic acetate oxidation (SAO) to hydrogen and carbon, which could explain the lack of acetoclastic methanogens.

The designed hydraulic retention time for the UASB reactors in this study, considering the data presented in item 2.1, would be approximately 10 hours. However, considering the flow rate informed by the WWTP workers (around $200 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$), the reactors are operating at an HRT of 1.87 days, 4.5 times the original design. This can be affecting the biomass in the reactors, either by inducing SAO, as discussed by Sundberg et al. (2013) or inhibiting/selecting microorganisms through lack of substrate.

Also, hydrogenotrophic methanogens, such as *Methanobacterium*, which presented significantly higher abundance than *Methanosaeta* in the UASB sludge, usually present dominance at thermophilic reactors and shows higher tolerance to stress conditions such as low pH, high volatile fatty acids concentration (VENKITESHWARAN et al., 2017; KOUGIAS et al., 2016) and high ammonia concentrations (AMHA et al., 2018), suggesting that there may be stress factors involved in the operation of the reactors causing inhibition of acetoclastic methanogens.

5.3.5 Bacteria domain

Firmicutes and *Bacteroidetes* are known to act in the hydrolysis step, being usually the most abundant groups of microorganisms in mesophilic anaerobic digestion plants (JÜNEMANN

et al., 2017), what was not observed in the UASB sludge analyzed, which had dominance of *Chloroflexi* (35.26%) and *Proteobacteria* (31.25%), followed by *Firmicutes* (12.58%) and *Caldiserica* (8.18%). *Proteobacteria* was the phylum with the highest growth after cultivation, representing almost 75% of the enriched sludge.

Chloroflexi are, in general, aerobic bacteria normally found in activated sludge systems (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2018) and reported to be common in systems adapted for biological nutrient removal (BJÖRNSSON et al., 2002). However, all the organisms from this phylum were from the *Anaerolineae* class, obligate anaerobes found in various types of natural and artificial anaerobic systems (ROSENKRANZ et al., 2013).

Leptolinea, from the order *Anaerolineales*, was 3.05% of the inoculum, while an uncultured genus from this order represented 30.7% of the sample, demonstrating the need to further study the microbiota involved in anaerobic digestion. Rosenkranz et al. (2013) operated an anaerobic batch reactor for acclimation of sludge with high phenol concentration feed (up to 1200 mg L⁻¹) and found that the most abundant microorganism in the specialized sludge at the end of the experiment was an uncultured *Anaerolinaceae* bacterium, within the *Chloroflexi* phylum. This family is also known to be associated with anaerobic degradation of oil-related compounds (ROSENKRANZ et al., 2013).

The abundance of *Firmicutes* – commonly found in sewage treatment plants –, higher in inoculum and lower in the enriched sludge, agree with the findings of Gonzalez-Fernandez et al. (2018), who compared sludge digesting domestic sewage and sludge adapted to digest microalgae. *Proteobacteria* are also frequently reported as a high portion of microorganisms in anaerobic sludges, including adapted sludge digesting microalgae (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2018).

In the *Firmicutes* phylum, the order identified was *Clostridiales*, a fermentative group of organisms that are thought to consume hydrocarbon intermediates and produce organic acid precursors, such as acetate and formate (ROSENKRANZ et al., 2013). This group represented 11.6% of the UASB sample, decreasing to 1.8% after cultivation, as expected, since acetate was the only substrate added. From this order, the main genus found was *Clostridium*, an important anaerobe that represented 4.3% of the sludge's biomass (*Clostridium sensu stricto 1*). Almost all members of this genus form butyrate as a fermentation product, except for the species *Clostridium ljungdahlii*, which produces acetate from fructose and from H₂/CO₂. In general,

Clostridium produce various organic acids and alcohols from fermentation of carbohydrates or peptones (WHITMAN et al., 2009). Also, between the few species of bacteria identified as SAOB (syntrophic acetate-oxidising bacteria – discussed in the previous section), one is *Clostridium ultunense* (MULLER et al., 2016).

From the phylum *Caldiserica*, the fourth highest abundance in the inoculum, the only genus identified was *Caldisericum*, a group that uses thiosulfate, sulfite and elemental sulfur as electron acceptors, known to be found in terrestrial hot springs (MORI, 2018). This phylum is not commonly reported as the main ones in anaerobic sludge treating domestic sewage, indicating the specificity of the university's sewage, which may be more similar to industrial wastewater.

Pseudomonas, the genus with the highest abundance in both the inoculum and the enriched sludge, with the largest growth observed in the reactor, are a known bacteria acting in acidogenesis in anaerobic systems (CHERNICHARO, 2007). Most species from this genus are strictly aerobic, while some can use nitrate as an electron donor, allowing anaerobic growth, where some species are known denitrifiers. This group can grow with ammonium or nitrate as nitrogen source and a single organic compound as carbon and energy source, with no nutritional supplements dependence, showing an ideal temperature for growth at 28°C for most species (PALLERONI, 2015).

Comparing the genera identified in this study with the one made by Venkiteshwaran et al. (2017) with sludges from 50 different sources, which had the phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Synergistes* as the most abundant, none of the most common genera appointed by the authors from these phyla were found in relevant abundance in the sludge analyzed here.

Syntrophobacter, a known genera of acetogenic bacteria commonly found in anaerobic reactors (CHERNICHARO, 2007), represented only 0.08% of the UASB sludge, and *Syntrophomonas*, also a syntrophic acetogen (VENKITESHWARAN et al., 2017), had an abundance of 0.06%. Muller et al. (2016) found abundance of *Syntrophomonas* between 2 – 3% when monitoring laboratory scale reactors fed with municipal household waste for 642 days, and Delforno et al. (2017) found 5.1% of abundance of *Syntrophobacter* in an UASB treating commercial laundry wastewater. The order *Syntrophobacterales* in the present study had six identified genera in the UASB sludge sample, which together had 1,06% abundance, including *Syntrophobacter*. These values may indicate some possible issues around acetogenic biomass, which could lead to the low abundance of acetoclastic methanogens and cause poor methane

production. Besides an elevation of hydrogen pressure and accumulation of acetogenesis products (CHERNICHARO, 2007), the presence of antibiotics in the sewage has also been reported as an inhibition factor for acetogenic syntrophic bacteria (AYDIN et al., 2015). Since there is a veterinary hospital inside the campus, residues of antibiotics can end up in the sewage system.

5.4 Conclusion

The UASB sludge used as inoculum for the cultivating reactor presented highest abundance of the hydrogenotrophic methanogen *Methanobacterium*, with significant lower abundance of the acetoclastic *Methanosaeta*, suggesting higher hydrogenotrophic than acetoclastic activity in the reactor. This can be due to lower concentration of acetate in the UASB, stress conditions such as low pH, high volatile fatty acids or ammonia concentration, or the characteristics of the sewage treated in the STP, which may be more similar to industrial than domestic wastewater and lead to specialization or inhibition of biomass.

The considerably high hydraulic retention time in which the UASB reactors are operating might also be affecting the diversity of the biomass, and maybe inducing syntrophic acetate oxidation (SAO), a metabolism that has yet to be more studied. *Syntrophobacter* and *Syntrophomonas*, the known genera of syntrophic acetogenic bacteria most commonly found in anaerobic reactors, represented only 0.08% and 0.06%, respectively, of the UASB sludge, which may indicate possible issues affecting acetogenic biomass.

In the *Bacteria* domain, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Caldisei* were the most abundant phyla in the inoculum, while an uncultured genus from the order *Anaerolineales* represented 30.7% of the sample.

A decrease in total abundance of archaeas was observed after cultivation, explained by the highest abundance of hydrogenotrophic methanogens in the inoculum, which decreased since the substrate used in the experiment was meant to enrich acetoclastic archaeas. The acetoclastic *Methanosaeta* increased in abundance from 0.12% to 1.37% after cultivation, indicating that the method was effective for cultivating acetoclastic methanogenic archaea. *Proteobacteria* was the *Bacteria* phylum with the highest growth after cultivation, representing almost 75% of the enriched sludge, in which *Pseudomonas* had the largest growth in the cultivating reactor.

References

- ABREU, E. F. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário**. 2007. 93 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- AMHA, Y. M. et al. Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 999-1014, 2018.
- ANTWI, P. et al. Functional bacterial and archaeal diversity revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing during potato starch processing wastewater treatment in an UASB, **Bioresource Technology**, v. 235, p. 348-357, 2017.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, D.C. : American Public Health Association, 2005.
- AYDIN, S. et al. Inhibitory effects of antibiotic combinations on syntrophic bacteria, homoacetogens and methanogens. **Chemosphere**, v. 120, p. 515-520, 2015.
- BANDARA, W. M. K. R. T. W. et al. Anaerobic treatment of municipal wastewater at ambient temperature: Analysis of archaeal community structure and recovery of dissolved methane, **Water Research**, v. 46, p. 5756-5764, 2012.
- BJÖRNSSON, L. et al. Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. **Microbiology**, v. 148, p. 2309-2318, 2002.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1621-1624, 2012.
- CARDOSO, A. M. et al. Archaea: Potencial Biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, 2003.
- CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Vol. 5 – Reatores Anaeróbios**. 246 p. Belo Horizonte : UFMG, 2007.
- COSTA, K. C.; LEIGH, J. A. Metabolic versatility in methanogens. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, p. 70-75, 2014.
- DELFORNO, T. P. et al. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 587-588, p. 389-398, 2017.
- DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass, **Rev Environ Sci Biotechnol** v. 7, p. 173-190, 2008.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. Phylum All. Euryarchaeota phy. nov. In: (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, p. 211-355, 2001.

GONZALEZ-FERNANDEZ, C. et al. Biochemical methane potential of microalgae biomass using different microbial inocula. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 1-11, 2018.

JÜNEMANN, S. et al. Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. **Journal of Biotechnology**, v. 261, p. 10-23, 2017.

KOUGIAS, P. G. et al. Dynamic functional characterization and phylogenetic changes due to Long Chain Fatty Acids pulses in biogas reactors. **Nature Science Report**, v. 6, n. 28810, 2016.

KURODA, K. et al. Community Composition of Known and Uncultured Archaeal Lineages in Anaerobic or Anoxic Wastewater Treatment Sludge. **Microb Ecol**, v. 69, p. 586-596, 2014.

LECKER, B. et al. Biological hydrogen methanation – A review. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1220-1228, 2017.

LEE, S. H. Evidence of syntrophic acetate oxidation by Spirochaetes during anaerobic methane production. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 543-549, 2015.

LETTINGA G. et al. High-Rate Anaerobic Waste-Water Treatment Using the UASB Reactor under a Wide Range of Temperature Conditions, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 2, p. 253-284, 1984.

MATOS, M. P. et al. Estimativa da produção e perdas de metano por diferentes modelos em reator UASB da ETE-UFLA. In: 30º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, **Anais de Congresso**, Natal/RN, 2019.

METCALF, L.; EDDY, H. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4 ed. Revisado por George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. David Stensel. New York : McGraw-Hill, 2003.

MORI, K. **Caldisericum**. Wiley Online Library. 2018. Available at: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm01477>> Accessed on: 09/03/19.

MULLER, B. et al. Bacterial community composition and fhs profiles of low- and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 47, 18 p, 2016.

PALLERONI, N. J. Pseudomonas. In: WHITMAN, W. B. (ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. John Wiley & Sons, 105 p., 2015.

ROSENKRANZ, F. et al. Relationship between phenol degradation efficiency and microbial community structure in an anaerobic SBR. **Water Research**, v. 47, p. 6739-6749, 2013.

SARTI, E. L. **Influência do Oxigênio no Crescimento de Arquéias Metanogênicas e**

Bactérias Redutoras de Sulfato em Reatores Anaeróbios em Batelada. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento), USP, 2007.

SCHINK, B.; STAMS, A. J. M. Syntrophism among Prokaryotes, **The Prokaryotes**, v. 2, p. 309-335, 2006.

SUNDBERG, C. et al. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 85, p. 612-626, 2013.

TABATABAEI, M. et al. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments, **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1214-1225, 2010.

THAUER, R. K. et al. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 579-591, 2008.

VENKITESHWARAN, K. et al. Correlating methane production to microbiota in anaerobic digesters fed synthetic wastewater. **Water Research**, v. 110, p. 161-169, 2017.

WHITMAN, W. B et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Volume Three: The Firmicutes.* New York : Springer, 1450 p., 2009.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação aos resultados de atividade metanogênica específica, que se mostraram menores que os comumente reportados na literatura, podem ser melhores entendidos observando a comunidade microbiana presente no lodo do reator UASB. Como apresentado no Artigo 2, as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas possuíam abundância significativamente maior que as acetoclásticas. Os ensaios de AME utilizaram somente acetato de sódio como substrato, sendo, portanto, mensurada apenas a atividade de arqueias acetoclásticas, as quais usualmente aparecem em maior quantidade em reatores UASB tratando esgoto doméstico. Porém, neste caso, a AME foi subestimada, já que não havia substrato adequado para a maior parte das arqueias metanogênicas presentes no inóculo. Por este motivo, recomenda-se, para trabalhos futuros, a avaliação da AME utilizando também formiato, propionato, entre outros substratos que avaliem a biomassa anaeróbia como um todo.

Além disso, sugere-se a investigação de possíveis lançamentos eventuais de efluentes químicos na rede de esgoto, com possível acúmulo de substâncias prejudiciais à degradação anaeróbia nos reatores, bem como se existem fatores causando a predominância de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e a presença bastante reduzida de bactérias acetogênicas/sintróficas.

Sugere-se também avaliar se o tempo de detenção hidráulico (TDH) sendo empregado nos reatores, quase 4,5 vezes o TDH de projeto, pode afetar a atividade e composição da biomassa anaeróbia, bem como o efeito que um tanque de equalização de vazão teria sobre a operação dos reatores, já que ocorre intermitência de fluxo de esgoto, ocasionando elevadas velocidades de subida do efluente dentro do UASB em alguns momentos e nenhuma entrada de carga orgânica em outros.