

# INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ IFCE *CAMPUS* MARACANAÚ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIAS RENOVÁVEIS

#### **MATHEUS MAIA DANTAS**

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

> MARACANAÚ 2021

# ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energias Renováveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) - Campus Maracanaú, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em energias renováveis. Área de concentração: Energias Renováveis.

Orientador: Prof. Dr. Auzuir Ripardo de Alexandria.

Coorientadora: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Instituto Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI
Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D192i Dantas, Matheus.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA / Matheus Dantas. - 2021. 82 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Energias Renováveis, Campus Maracanaú, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Auzuir Ripardo de Alexandria. Coorientação: Prof. Dr. Oscarina Viana de Sousa.

1. Microbiota. 2. Ecossistema aquático. 3. Potencial biotecnológico. 4. Consórcio funcional. 5. Gerenciamento microbiano. I. Titulo.

CDD 620.91

#### MATHEUS MAIA DANTAS

# ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Energias Renováveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) - Campus Maracanaú, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em energias renováveis. Área de concentração: Energias Renováveis.

Aprovado (a) em: /
BANCA EXAMINADORA
Prof. Dr. Auzuir Ripardo de Alexandria (Orientador)  Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – <i>Campus</i> Fortaleza
Prof. Dr. Franklin Aragão Gondim  Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – <i>Campus</i> Maracanan
Profa. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva

Fundação Cearense de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)

À Ruby Maia Dantas.

A meus pais e avós.

Aos meus orientadores.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a meus pais, Antônia Marta Maia Dantas e Gilson Carneiro Dantas, pelo apoio à minha carreira acadêmica.

À Ruby Maia Dantas por todo o amor genuíno, carinho, sinceridade e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu orientador, Auzuir Ripardo de Alenxandria, pela disponibilidade em orientar o desenvolvimento desta pesquisa, por todo incentivo ao longo do percurso e por ser exemplo de profissionalismo, empatia e respeito.

À minha co-orientadora, Oscarina Viana de Sousa, por aceitar fazer parte deste projeto, pelo acolhimento, dedicação, ensinamentos e suporte ao planejamento e desenvolvimento desta pesquisa e por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

À Fátima Cristiane Teles de Carvalho pelas contribuições ao planejamento e execução dos experimentos realizados, pela amizade, companheirismo, por sempre me motivar e por tornar a rotina no laboratório mais leve e divertida.

À Jéssica Lucinda Saldanha da Silva pela amizade, conhecimento compartilhado, pelos conselhos e pela cooperação para o desenvolvimento deste trabalho.

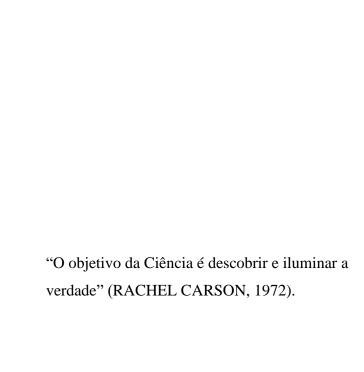
À Anna Luisa de Carvalho Brito pela amizade, experiências compartilhadas e apoio na rotina laboratorial.

Aos demais membros do LAMAP que contribuíram com a realização deste projeto.

À Rafael Pereira dos Santos e Vitória Gonçalves de Sousa por todo apoio durante minha inscrição no processo seletivo do mestrado, pela amizade e contribuições ao desenvolvimento desta pesquisa.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará por todas as oportunidades e contribuição à minha formação como Mestre.



#### **RESUMO**

A prospecção, caracterização das funções metabólicas e relações ecológicas de microrganismos podem ser útil para otimizar sistemas de engenharia que tratam resíduos orgânicos e produzem energia renovável na forma de biogás. Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar grupos funcionais bacterianos para a construção de um inóculo com potencial para otimizar o tratamento de resíduos sólidos orgânicos e produção de biogás em reatores anaeróbios. Os microrganismos foram isolados de sedimento de reservatório urbano com meios de cultura seletivos para cada grupo funcional bacteriano. Foram isoladas 60 cepas bacterianas: 10 bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC), utilizadas como grupo controle, 10 bactérias lipolíticas (BL), 10 bactérias proteolíticas (BP), 10 bactérias amilolíticas (BAm) e 20 bactérias acidogênicas (BAc). As cepas isoladas (60) foram caracterizadas morfotintorialmente, submetidas a teste de oxidação e fermentação (OF) de carboidrato (45) e testes de sobrevivência (42) em diferentes condições de temperatura e pH. Os resultados positivos em cada teste foram considerados pré-requisito para a submissão a teste de antagonismo (20) para seleção de bactérias capazes de crescer em inter-relações ecológicas harmônicas para construção dos consórcios bacterianos. Dois consórcios com maior diversidade metabólica foram encapsulados pelo método de extrusão e a viabilidade das macropérolas formadas foi analisada pela técnica de *Pour Plate*. A análise dos resultados mostrou que, das 60 cepas isoladas, 75% apresentaram parede celular Gram-negativa, 20% Gram-positiva e 5% foram viáveis, mas não cultiváveis; dos 45 submetidas ao teste de OF: 93% foram classificados como anaeróbias facultativas e 3% foram inertes; entre as 40 submetidas a testes de sobrevivência: 100% sobreviveram à 40°C e 70% à 45°C; 90% sobreviveram em pH 5 e 97% em pH 6. As combinações de cepas realizadas a partir do teste de antagonismo permitiu a construção de 33 consórcios formados por duas cepas bacterianas e 11 consórcios formados por 3 cepas. A análise da viabilidade do processo de encapsulação mostrou que ambos os inóculos (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) mantiveram a viabilidade das cepas bacterianas para o período de 24 hora e sete dias, em que a quantificação do consórcio C<sub>1</sub> foi de  $5.53 \times 10^{10}$  est. e  $2.05 \times 10^{8}$  UFC/g, enquanto o consórcio  $C_2$  foi de  $6.17 \times 10^{10}$  est. e  $4.8 \times 10^{8}$ UFC/g, respectivamente. A prospecção de grupos funcionais bacterianos permitiu a construção de inóculos com ampla diversidade metabólica e potencial para otimizar o processo de digestão anaeróbia, constituindo importante etapa para posterior aplicação em sistemas de engenharia.

**Palavras-chave:** Microbiota. Ecossistema aquático. Potencial biotecnológico. Consórcio funcional. Gerenciamento microbiano.

#### **ABSTRACT**

Prospecting, characterizing the metabolic functions and ecological relationships of microorganisms can be useful to optimize engineering systems that treat organic waste and produce renewable energy in the form of biogas. This work aimed to isolate and characterize bacterial functional groups for the construction of an inoculum with the potential to optimize the treatment of organic solid waste and biogas production in anaerobic reactors. The microorganisms were isolated from urban reservoir sediment with selective culture media for each bacterial functional group. Sixty bacterial strains were isolated: 10 cultivable heterotrophic bacteria (BHC), used as control group, 10 lipolytic bacteria (BL), 10 proteolytic bacteria (BP), 10 amylolytic bacteria (BAm) and 20 acidogenic bacteria (BAc). The isolated strains (60) were morphotintorially characterized, submitted to carbohydrate oxidation and fermentation (OF) test (45) and survival tests (42) under different temperature and pH conditions. The positive results in each test were considered a prerequisite for submission to the antagonism test (20) for the selection of bacteria capable of growing in harmonious ecological interrelationships for the construction of bacterial consortia. Two consortia with greater metabolic diversity were encapsulated by the extrusion method and the viability of the formed macrobeads was analyzed by the Pour Plate technique. The analysis of the results showed that, of the 60 strains isolated, 75% presented Gram-negative cell walls, 20% Gram-positive and 5% were viable, but not cultivable; of the 45 submitted to the OF test: 93% were classified as facultative anaerobes and 3% were inert; among the 40 submitted to survival tests: 100% survived at 40°C and 70% at 45°C; 90% survived at pH 5 and 97% at pH 6. The combinations of strains performed from the antagonism test allowed the construction of 33 consortia formed by two bacterial strains and 11 consortia formed by 3 strains. The analysis of the viability of the encapsulation process showed that both inoculums (C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>) maintained the viability of the bacterial strains for a period of 24 hours and seven days, in which the quantification of the  $C_1$  consortium was  $5.53 \times 10^{10}$  est. and 2.05×10<sup>8</sup> CFU/g, while the C<sub>2</sub> consortium was 6.17×10<sup>10</sup> est. and 4.8×10<sup>8</sup> CFU/g, respectively. The prospection of bacterial functional groups allowed the construction of inoculum with wide metabolic diversity and potential to optimize the anaerobic digestion process, constituting an important step for later application in engineering systems.

**Keywords:** Microbiota. Aquatic ecosystem. Biotechnological potential. Functional consortium. Microbial management.

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de localização do reservatório urbano: Açude Santo Anastácio	37
Figura 2 – Fluxograma do procedimento amostragem de sedimento em corpo hídrico	38
Figura 3 – Fluxograma do processamento da amostra de sedimento em laboratório	39
Figura 4 – Fluxograma da semeadura pela técnica de Spread Plate	40
Figura 5 – Fluxograma do isolamento bacteriano.	41
Figura 6 – Fluxograma do procedimento de coloração de Gram.	42
Figura 7 – Fluxograma do teste de OF para bactérias Gram-negativas	43
Figura 8 – Fluxograma do teste de OF para bactérias Gram-positivas	43
Figura 9 – Fluxograma da análise de termorresistência bacteriana	44
Figura 10 – Fluxograma do teste de sobrevivência em diferentes faixas de pH	45
Figura 11 – Fluxograma do teste de antagonismo bacteriano.	46
Figura 12 - Critérios de seleção para formação de consórcios.	46
Figura 13 – Fluxograma do processo de obtenção do pellet.	47
Figura 14 – Fluxograma do processo de encapsulamento bacteriano.	48
Figura 15 – Fluxograma da reativação das células bacterianas	48
Figura 16 – Fluxograma da semeadura pela técnica de Pour Plate.	49
Figura 17 – Crescimento das colônias bacterianas após o processamento da amostra de	
sedimento proveniente do Açude Santo Anastácio (ASA)	50
Figura 18 - Resultado do teste de OF realizado para cepas bacterianas de sedimento do AS	A.
	55
Figura 19 – Resultado do teste de sobrevivência (temperatura e pH) das cepas bacterianas.	56
Figura 20 – Resultados do teste de antagonismo bacteriano.	58
Figura 21 – Crescimento dos consórcios C <sub>1</sub> e C <sub>2</sub> , em meio de cultura, após o período de	
incubação	62
Figura 22 – Resultados das etapas de encapsulação para o consórcio C <sub>1</sub>	63

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Status das plantas de biogás brasileiras (2020).	24
Tabela 2 – Origem do substrato utilizado nas plantas de biogás em operação (2020)	24
Tabela 3 – Bioaumentação aplicada ao processo de digestão anaeróbia	33
Tabela 4 – Quantificação das unidades formadoras de colônias de sedimento do ASA	51
Tabela 5 – Consórcios bacterianos formados a partir do teste de antagonismo bacteriano	61
Tabela 6 – Quantificação das unidades formadoras de colônias presentes nas macropérolas	s. 63

# LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Geração de energia elétrica por fonte no Brasil.	23
Gráfico 2 – Características morfotintoriais dos isolados bacterianos provenientes de	
sedimento do ASA, de acordo com os grupos funcionais	53
Gráfico 3 – Agrupamento das cepas bacterianas provenientes de sedimento do ASA quan	ıto à
estrutura da parede celular	54
Gráfico 4 – Agrupamento bacteriano quanto a via de oxidação e/ou fermentação da glicos	se. 55
Gráfico 5 – Sobrevivência bacteriana em diferentes condições ambientais: temperatura e	pH.
	57

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos consórcios microbianos.	30
Quadro 2 – Principais modelos de reatores utilizados no Brasil	35
Quadro 3 - Classificação da morfologia e parede celular dos isolados de sedimento	do ASA.
	52
Quadro 4 – Resultado individual do teste de antagonismo realizado para as cepas se	elecionadas
nos testes anteriores.	60

#### LISTA DE SIGLAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASA Açude Santo Anastácio

BAc Bactérias acidogênicas

BAm Bactérias amilolíticas

BHC Bactéria heterotróficas cultiváveis

BHI Brain Heart Infusion

BL Bactérias lipolíticas

BP Bactérias proteolíticas

C Consórcio

CSRT Continuous Stirred Tank Reactor

DA Digestão anaeróbia

EPE Empresa de Pesquisa Energética

IDH Índice de Desenvolvimento Humano

ISO Organização Internacional para Padronização

LABOMAR Instituto de Ciências Mar

LAMAP Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado

MME Ministério de Minas e Energia

LB Luria Bertani

NBR Norma Brasileira

ODS Objetivos do Desenvolvimento Sustentável

OF Oxidação-fermentação

ONU Organização das Nações Unidas

PNRS Política Nacional de Resíduos Sólidos

RSO Resíduos sólidos orgânicos

RSU Resíduos sólidos urbanos

TSA Ágar triptona de soja

UASB Upflow Anaerobic Sludge Blanket

UFC Universidade Federal do Ceará

VMNC Viável, mas não cultivável

#### LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

Nm³/ano Normal Metro Cúbico por ano

Nº Número

N<sub>2</sub> Nitrogênio

O<sub>2</sub> Oxigênio

H<sub>2</sub>S Sulfeto de Hidrogênio

NH<sub>3</sub> Amônia

H<sub>2</sub> Hidrogênio

CO Monóxido de carbono

COVs Compostos orgânicos voláteis

pH Potencial hidrogeônico

CO<sub>2</sub> Dióxido de carbono

CH<sub>4</sub> Metano

C/N Relação carbono/nitrogênio

> Menor que

°C Grau Celsius

< Maior que

Grau

' Minuto

" Segundo

mm Milímetros

g Grama

mL Mililitro

+ Positivo

- Negativo

RPM Rotação por minuto

μm Micrometro

UFC/g Unidades formadora de colônia por grama

UFC/mL Unidade formadora de colônia por mililitro

G+ Gram positivo(a)

G- Gram negativo(a)

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Justificativa	20
1.2 Objetivo Geral	21
1.2.1 Objetivos específicos	21
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	22
2.1 Cidades inteligentes	22
2.2 Energia renovável: biogás	23
2.3 Resíduos sólidos urbanos	25
2.4 Digestão anaeróbia	26
2.4.1 Hidrólise	27
2.4.2 Acidogênese	27
2.4.3 Acetogênese	27
2.4.4 Metanogênese	28
2.5 Microbioma de reatores	28
2.6 Consórcios microbianos	30
2.6.1 Bioaumentação	31
2.7 Parâmetros operacionais em reatores anaeróbios	
2.7.1 Substrato	34
2.7.2 Razão carbono/nitrogênio (C/N)	34
2.7.3 Nutrientes	34
2.7.4 Configurações do reator	35
2.7.5 Inóculo	35
2.7.6 Temperatura	36
2.7.7 pH	36
2.7.8 Tempo de retenção hidráulica	36
3 METODOLOGIA	
3.1 Origem dos microrganismos	37
3.1.1 Caracterização da área	37
3.1.2 Amostragem do sedimento	
3.2 Processamento da amostra	
3.3 Quantificação das colônias microbianas viáveis	39
3.4 Isolamento das colônias microbianas	
3.5 Caracterização morfotintorial	41

3.6 Teste de oxidação e fermentação (OF)	42
3.6.1 Teste de OF para bactérias Gram-negativas	42
3.6.2 Teste de OF para bactérias Gram-positivas	43
3.7 Testes de sobrevivência bacteriana	44
3.7.1 Teste de sobrevivência em diferentes temperaturas	44
3.7.2 Teste de sobrevivência em diferentes faixas de pH	44
3.8 Teste de antagonismo bacteriano	45
3.9 Formação dos consórcios bacterianos	46
3.10 Formação do inóculo bacteriano	46
3.10.1 Concentração da biomassa bacteriana	47
3.10.2 Encapsulação da biomassa bacteriana	47
3.10.3 Teste de reativação e quantificação da biomassa encapsulada	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Contagem das colônias microbianas viáveis	50
4.2 Características morfotintoriais	52
4.3 Via metabólica: oxidativa e/ou fermentativa	54
4.4 Sobrevivência bacteriana em diferentes condições ambientais	56
4.5 Antagonismo bacteriano e combinações de consórcios	58
4.6 Viabilidade da encapsulação bacteriana	62
5 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

#### 1 INTRODUÇÃO

O rápido crescimento populacional e desenvolvimento urbano, tecnológico e industrial exercem influência no aumento da geração de resíduos sólidos orgânicos (RSO) e na demanda de energia, tornando um desafio a gestão sustentável dessa problemática (SAMANI; HOSSEINI-MOTLAGH, 2021; ZHANG; LOH; ZHANG, 2019).

Os RSO podem causar impactos ambientais negativos e de saúde pública, quando não tratados adequadamente, e os combustíveis fósseis, principal fonte de energia no mundo, são poluentes e não renováveis (BABU; VERAMENDI; RENE, 2021; GAZALI; MOQSUD, 2017). Por isso, o uso de tecnologias sustentáveis para solucionar a gestão de resíduos e produção de energia renovável torna-se uma prioridade global (AL-WAHAIBI *et al.*, 2020).

A digestão anaeróbia (DA), processo capaz de converter resíduos orgânicos em biogás e digestato, permite tratar resíduos sólidos urbanos, gerar energia renovável, reduzir a poluição ambiental e contribuir para o alcance de metas internacionais, uma vez que o biogás pode ser aplicado como energia térmica, elétrica ou veicular e o digestato como fertilizante orgânico, substituindo os combustíveis fósseis e fertilizantes químicos, respectivamente (GLIVIN *et al.*, 2021; IGLESIAS *et al.*, 2021; JIMENEZ *et al.*, 2020).

Em princípio, qualquer material orgânico, composto principalmente por carboidratos, lipídios e proteínas, pode ser degradado por microrganismos em reatores anaeróbios e o biogás pode ser gerado a partir da biomassa residual de esterco animal, lodo de esgoto, águas residuais, resíduos agrícolas, resíduos florestais e resíduos alimentares (WESTERHOLM; LIU; SCHNÜRER, 2020; LI; CHEN; WU, 2019; SIDDIQUE; WAHID, 2018).

Durante o processo de DA, a produção estável e eficiente de biogás ocorre ao longo de quatro fases (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), em que a ação mútua e sintrófica de grupos microbianos com perfis funcionais específicos (hidrolítico, acidogênico, acetogênico e metanogênico) degrada a matéria orgânica em produtos intermediários, em condição anaeróbia (WU *et al.*, 2021; AWHANGBO *et al.*, 2020).

No entanto, fatores que afetam as características, estrutura, funções, interação sintrófica e potencialidades do microbioma em reatores ainda necessitam de maiores estudos para compreensão e aplicação do conhecimento obtido, o que torna a Microbiologia do processo um parâmetro de grande relevância (PATIL *et al.*, 2021).

Uma vez que sistemas projetados de DA são baseados na atividade metabólica microbiana envolvida no complexo processo de conversão da matéria orgânica em metano em

zonas anaeróbias de ambientes naturais (SHIMA *et al.*, 2020; OZBAYRAM *et al.*, 2018), a comparação de informações funcionais de ambientes com características semelhantes, como sedimentos de ecossistemas aquáticos, pode resultar em novos conhecimentos sobre o potencial microbiano com valor para aplicações biotecnológicas (BERAUD-MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

Ecossistemas naturais, em que o ambiente de crescimento heterogêneo é caracterizado por gradientes de fatores abióticos (intensidade de luz, temperatura, pH, concentrações de oxigênio dissolvido, dióxido de carbono e nitrogênio), são ocupados por microrganismos especificamente adaptados (SHAHAB *et al.*, 2020), constituindo uma fonte de microrganismos com potencial biotecnológico.

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar grupos funcionais bacterianos para a construção de um inóculo com potencial para otimizar o tratamento de resíduos sólidos orgânicos e produção de biogás em reatores anaeróbios.

#### 1.1 Justificativa

O acesso à energia limpa e acessível foi reconhecido como um dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos na Agenda 2030 (ONU, 2015).

A tecnologia de DA permite a valorização de resíduos orgânicos por meio da recuperação de nutrientes (digestato) e geração de energia (biogás) (LYTRAS *et al.*, 2021).

Apesar do amplo conhecimento técnico gerado sobre sistemas de DA, os aspectos microbiológicos ainda são apenas parcialmente compreendidos quando comparados às áreas de engenharia, bioquímica, monitoramento, dentre outras (KOVALOVSZKI *et al.*, 2020).

A compreensão da ecologia, dinâmica e interações naturais microbianas permite expandir aplicações de engenharia microbiana, visando realizar funções mais complexas em reatores fechados e definidos (JOHNS *et al.*, 2016).

Estratégias baseadas em Microbiologia para gerenciar reatores anaeróbios exigem o entendimento de como comunidades microbianas reagem a distúrbios operacionais ou ambientais (CARBALLA; REGUEIRO; LEMA, 2015).

Prevê-se que o gerenciamento de recursos microbianos avançados e intervenções na composição microbiana contribuirão significativamente com setor de biogás, deixando de ser considerados uma "caixa preta" (KOUGIAS; ANGELIDAKI, 2018).

#### 1.2 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar grupos funcionais bacterianos para a construção de um inóculo com potencial para otimizar o tratamento de resíduos sólidos orgânicos e produção de biogás em reatores anaeróbios.

#### 1.2.1 Objetivos específicos

- Isolar bactérias hidrolíticas (lipolíticas, proteolíticas e amilolíticas) e acidogênicas de sedimento de reservatório urbano;
- Caracterizar fenotípica e bioquimicamente os isolados bacterianos;
- Testar a capacidade de sobrevivência em diferentes condições ambientais;
- Caracterizar as relações ecológicas existentes para formar consórcios;
- Encapsular os consórcios bacterianos;
- Analisar a sobrevivência das cepas bacterianas ao processo de encapsulação.

#### 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 2.1 Cidades inteligentes

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU) (2018), cerca de 55% da população mundial vive em áreas urbanas. Estima-se que até 2050 aumentará para 70%, correspondendo a 2,5 bilhões de habitantes. Apesar do acelerado crescimento populacional e desenvolvimento urbano, as cidades apresentam lenta adaptação em termos de infraestrutura, organização municipal, serviços e processos gerais (ABU-RAYASH; DINCER, 2021).

A pressão exercida pela dinâmica organizacional das cidades contemporâneas resulta em elevado consumo de recursos e alta produção de resíduos, contribuindo com problemas sociais, econômicos e ambientais. Para melhorar a qualidade de vida, debates enfocam o papel da sustentabilidade no planejamento e desenvolvimento urbano (BIBRI; KROGSTIE, 2017).

Em 2015, a assembleia geral da ONU criou a "Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável", um plano de ação pautado em 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) a serem alcançados por meio de uma parceria global visando a superação de problemas sociais, econômicos e ambientais. Denominado "Cidades e comunidades sustentáveis", o ODS 11 tem como objetivo promover a inclusão, segurança, resiliência e sustentabilidade nas cidades e comunidades do mundo (ONU, 2015).

No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabelece a NBR ISO 37120 "Desenvolvimento sustentável de comunidades – indicadores para serviços urbanos e qualidade de vida" que aborda definições e metodologias para um conjunto de indicadores para cidades sustentáveis que orientam os municípios brasileiros. Em seu complemento, a NBR ISO 37122 "Cidades e comunidades sustentáveis – indicadores para cidades inteligentes" aborda um conjunto de indicadores para cidades inteligentes que permitem a medição e avaliação do desempenho da gestão de serviços e qualidade de vida das cidades em áreas como infraestrutura, mobilidade, tecnologia e sustentabilidade.

As cidades são ambientes complexos e dinâmicos, cuja compreensão é necessária para elaboração de planos capazes de modelar, prever e formular estratégias de regulação ou desenvolvimento (BENCKE; PEREZ, 2018). As abordagens de cidades inteligentes, propostas para solucionar problemas e limitações relacionados a infraestrutura e qualidade ambiental por meio de tecnologias de informação e comunicação, tem atraído interesse entre residentes, fornecedores e visitantes (KAYA *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2019).

Fundamentado no tripé do desenvolvimento sustentável, o conceito de cidades inteligentes associa-se com o princípio de sustentabilidade para solucionar os desafios emergentes das cidades (CURY; MARQUES, 2017). E, nas últimas décadas, o surgimento e adequação de cidades inteligentes, proporcionou a construção de ambientes urbanos eficientes e habitáveis como solução para problemas de infraestrutura urbana, tomada de decisão e sistemas de gestão sustentável (THORNBUSH; GOLUBCHIKOV, 2021).

#### 2.2 Energia renovável: biogás

O desempenho energético é essencial para garantir o desenvolvimento sustentável em todo o mundo, pois a energia é um parâmetro fundamental para o desenvolvimento socioeconômico, abrangendo recursos energéticos e níveis econômicos relacionados a planos de desenvolvimento e políticas de consumo de energia dos países (AHMAD; ZHANG, 2020).

O uso de energia renovável, considerada sustentável e limpa, oferece a oportunidade de conter os impactos ambientais, decorrentes do uso de recursos não renováveis, e o futuro esgotamento dos recursos fósseis. As fontes de energia renováveis mais importantes são a energia eólica, solar, fotovoltaica e a energia de biomassa (FREITAS *et al.*, 2019; MILTNER; MAKARUK; HARASEK, 2017).

No Brasil, de acordo com a Empresa de Pesquisa Energética (EPE) (2021) do Ministério de Minas e Energia (MME), as fontes renováveis representam 84,8% da matriz energética nacional, destacando-se como fontes de geração de energia elétrica a energia de hidroelétricas (65,2%), biomassa (9,1%) e eólica (8,8%), conforme observa-se no Gráfico 01.

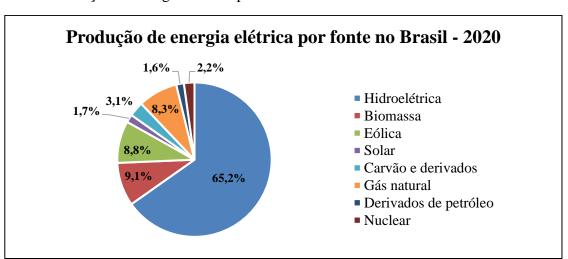


Gráfico 1 – Geração de energia elétrica por fonte no Brasil.

Fonte: Adaptado de Empresa de Pesquisa Energética (2021).

A biomassa, proveniente de processos naturais ou antropogênicos, possui como principais componentes orgânicos: proteínas, lipídios e carboidratos (ZHAO *et al.*, 2020; VASSILEV *et al.*, 2010). E pode ser convertida em diferentes fontes de energia como: vapor, óleo, metanol, etanol, biodiesel e biogás (PRABHU *et al.*, 2021).

A biomassa residual se destaca como matéria-prima para a produção de biogás em sistemas de digestão anaeróbia em escala global devido à abundância, a possibilidade de destinação ambientalmente adequada e por não competir com a produção de alimentos (DESSIE *et al.*, 2020; MILTNER; MAKARUK; HARASEK, 2017).

De acordo com a CIBiogás (2021), no ano de 2020 havia um total de 675 plantas de biogás no Brasil: 638 plantas em operação, 26 em implementação e 11 em reforma. Somadas apresentam capacidade para produção anual de 2,2 bilhões de Nm³ por ano de biogás, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Status das plantas de biogás brasileiras (2020).

Condição	Nº de plantas	Volume (Nm³/ano)
Operação	638	1,83 bilhão
Implementação	26	349,96 milhões
Reforma	11	43,35 milhões
Total	675	2,2 bilhões

Fonte: CIBiogás (2021).

Em relação à distribuição das 638 plantas de biogás em operação quanto a origem do substrato utilizado, 503 utilizam resíduos da agropecuária, 78 da indústria e 57 de aterro sanitário e estações de tratamento de esgoto (RSU e ETE). Apesar do maior número de plantas tratando resíduos agropecuários, a maior produção de biogás é proveniente das plantas que tratam RSU (CIBIOGÁS, 2021), conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Origem do substrato utilizado nas plantas de biogás em operação (2020).

Origem do substrato	Nº de plantas	Volume (Nm³/ano)
Agropecuária	503	203.048.019
Indústria	78	283.795.333
RSU e ETE	57	1.342.221.982
Total	638	1.829.065.334

Fonte: CIBiogás (2021).

O biogás é composto por uma mistura de gases como metano (60%), dióxido de carbono (30%) e outras substâncias traço como nitrogênio (N<sub>2</sub>), oxigênio (O<sub>2</sub>), sulfeto de hidrogênio

(H<sub>2</sub>S), amônia (NH<sub>3</sub>), hidrogênio (H<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), compostos orgânicos voláteis (COVs) e siloxanos (ADAN *et al.*, 2019; MATHERI *et al.*, 2018).

Além do metano, os demais componentes do biogás são considerados impurezas, sendo necessária a remoção. Ao atingir 96,5% de metano, passa a ser considerado como biometano, aumenta o calor específico, minimiza a corrosão e garante sua qualidade como fonte de energia elétrica, térmica, veicular, podendo também ser injetado em dutos de gás natural (ZHANG *et al.*, 2021; NEVZOROVA; KUTCHEROV, 2019; ARYAL *et al.*, 2018; MILANEZ *et al.*, 2018).

#### 2.3 Resíduos sólidos urbanos

O crescimento populacional, o desenvolvimento da economia, a tendência de urbanização, industrialização e modernização e a mudança nos padrões de consumo resultam no aumento da geração de resíduos sólidos urbanos (RSU), tornando sua gestão essencial para proteger a saúde humana e ambiental, aumentar a eficiência dos recursos e garantir a sustentabilidade (KAYA *et al.*, 2021; KUMAR; SAMADDER, 2017).

Os RSU são compostos principalmente de materiais provenientes de atividades domésticas, comerciais, de saúde e de construção, categorizados em resíduos orgânicos e inorgânicos (MISHRA *et al.*, 2021; ZAMRI *et al.*, 2021).

De acordo com a Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (2020), a geração total de RSU entre 2010 e 2019 aumentou de 67 milhões para 79 milhões de toneladas por ano, apresentando predominância de matéria orgânica (45,3%) na composição média nacional.

A gestão dos RSU é um complexo processo composto por etapas de coleta, transporte, tratamento e disposição final de resíduos (MÜLLER *et al.*, 2021). Por isso, há uma crescente demanda global por sistemas eficientes que reduzam os impactos ambientais e aumentem a recuperação de produtos de valor agregado e energia (LIU *et al.*, 2017).

Vários países incentivam políticas públicas que visam a redução da geração de resíduos, estimulando à promoção da economia circular por meio de reuso e reciclagem, e seu tratamento pelo aproveitamento energético (SILVA; CAPANEMA, 2019).

No Brasil, a Lei Nº 12.305 de 2010 instituiu a Política Nacional dos Resíduos Sólidos (PNRS) que dispõe sobre a gestão integrada e o gerenciamento de resíduos sólidos, que tem entre os objetivos a adoção, desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias limpas para minimizar impactos ambientais, bem como o tratamento dos resíduos sólidos e disposição final

ambientalmente adequada. E a Lei Nº 13.576 de 2017 dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), em complemento a Política Energética Nacional (Lei nº 9.478 de 1997), com objetivos de atender a compromissos firmados no Acordo de Paris, reduzir as emissões de gases do efeito estufa e promover a regularização da produção, expansão e uso de biocombustíveis na matriz energética nacional.

O tratamento e recuperação de energia de RSU desempenha relevante papel na gestão de RSU, uma vez que atende a requisitos de consumo a custos operacionais mínimos, elimina a fração orgânica, e contribui para desenvolvimento econômico, para proteção ambiental e da saúde humana (ISTRATE *et al.*, 2021; GUO *et al.*, 2021; IQBAL; KANG, 2021).

#### 2.4 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia (DA) é um processo biológico de degradação da matéria orgânica que ocorre naturalmente em ambientes anaeróbios, em que microrganismos, sobretudo dos domínios Bacteria e Archaea, metabolizam o substrato orgânico durante uma série de reações bioquímicas, convertendo-o em biogás e digestato (TYAGI *et al.*, 2021; BRÉMOND *et al.*, 2018).

O processo de DA é dividido em quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (MA; CHEN; NDEGWA, 2021). Cada uma ocorre de forma interdependente, em que a ação sinérgica de diferentes grupos funcionais microbianos degrada a matéria orgânica complexa em substâncias simples que são utilizadas na fase seguinte (OZBAYRAM *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2018).

A conversão de substratos em produtos alvo é dirigida pelo metabolismo de grupos funcionais microbianos com características específicas: fisiologia, necessidades nutricionais, diferentes taxas de crescimento e capacidade de sobrevivência. Para a eficiência e estabilidade do processo, deve haver um balanceamento na abundância e atividade dos consórcios microbianos para a utilização bem-sucedida de subprodutos intermediários de cada estágio (XU et al., 2021; BERAUD-MARTÍNEZ et al., 2021; AWHANGBO et al., 2020; LI et al., 2016).

A tecnologia de DA é empregada no tratamento de resíduos orgânicos e produção de produtos de valor agregado como biogás em sistemas de engenharia, evidenciando que o processamento microbiológico de resíduos tem se mostrado uma ferramenta para produção de energia renovável (ZHANG et al., 2018; PANDA et al., 2016).

#### 2.4.1 Hidrólise

Na fase de hidrólise, considerada relativamente lenta, as bactérias hidrolíticas atuam no processo de fermentação liberando enzimas que, ao serem adsorvidas na superfície do substrato orgânico, hidrolisam o material macromolecular como lipídios, carboidratos e proteínas, transformando-os em compostos moleculares mais simples, solúveis em água como ácidos graxos, açúcares e aminoácidos (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014; COELHO; DROSTE; KENNEDY, 2011; VEEKEN; HAMELERS, 1999). As bactérias hidrolíticas atuam tanto como produtoras de enzimas hidrolíticas quanto como utilizadoras de produtos de hidrólise (LI; CHEN; WU, 2019).

#### 2.4.2 Acidogênese

Na fase de acidogênese há a atuação de bactérias fermentativas anaeróbias restritas e, em menor número, bactérias anaeróbias facultativas que são responsáveis por converter os produtos da hidrólise em substâncias simples com baixo peso molecular como ácidos graxos voláteis (acético, propiônico, butírico, láctico, pirúvico e fórmico), álcoois, aldeídos e de gerar subprodutos como amônia (NH<sub>3</sub>), gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) (WANG *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2014).

As bactérias acidogênicas são capazes de realizar suas atividades metabólicas em pH muito baixo, em torno da faixa 4, porém, a maioria estritamente anaeróbia é afetada pela presença de oxidantes como o oxigênio ou nitrato que podem comprometer o processo de DA (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014). Algumas espécies bacterianas ativas na fase de hidrólise também são ativas durante a fase acidogênica, sendo chamadas de bactérias fermentativas (MANYI-LOH *et al.*, 2013).

#### 2.4.3 Acetogênese

Na fase de acetogênese, as bactérias acetogênicas digerem os substratos produzidos na acidogênese transformando-os em acetato, gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>), (RABII *et al.*, 2019). É uma importante etapa para o equilíbrio do processo, uma vez que os produtos gerados são considerados precursores para formação de metano (CH<sub>4</sub>). Além disso, a presença de alguns ácidos graxos voláteis pode inibir a fase de metanogênese em altas concentrações, mesmo em pH neutro (WANG *et al.*, 2018).

Microrganismos acetogênicos, podem ser isolados de diversos habitats anaeróbios, incluindo sedimentos, solos, lagos de minas de carvão ácidas, material fecal, ambientes psicrotróficos e termofílicos (DRAKE; GÖßNER; DANIEL, 2008).

#### 2.4.4 Metanogênese

Na fase de metanogênse, as arqueas metanogênicas transformam os subprodutos da acetogênese em metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (REN *et al.*, 2018). A formação do metano pode ocorrer pela ação das arqueas acetoclásticas que reduzem do ácido acético formando CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> ou pela ação das arqueas hidrogenotróficas que reduzem CO<sub>2</sub> na presença de H<sub>2</sub> (IZUMI *et al.*, 2010). Quando comparadas as taxas de crescimento, as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas apresentam taxa de crescimento mais rápida que as arqueas metanogênicas acetoclásticas (AMIN *et al.*, 2021).

Arqueas metanogênicas são microrganismos estritamente anaeróbios comumente encontrados em ambientes anóxicos como sedimentos de água doce, áreas de tundra, pântanos e trato intestinal de ruminantes e cupins, além de ambientes criados pelo homem como campos de arroz, reatores anaeróbios de estações de efluentes e biogás (THAUER, 2010).

#### 2.5 Microbioma de reatores

A microbiota corresponde aos microrganismos que formam um microbioma, que por sua vez é formado pelo habitat, incluindo os microrganismos (bactérias, arqueas, eurcariotas e vírus), seus genomas e as condições ambientais circundantes (BERG *et al.*, 2020; MARCHESI; RAVEL, 2015).

O avanço, redução de custos e eficiência de tecnologias de sequenciamento, plataformas e ferramentas de bioinformática, possibilitou ampliar a compreensão sobre o potencial funcional e diversidade microbiana em variados ecossistemas, permitindo descobertas em taxonomia, ecologia microbiana, biogeoquímica e biologia evolutiva (TAŞ *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2019).

Em reatores, a composição, estrutura e atividade do microbioma são formadas por milhares de espécies com funcionalidades específicas, envolvidas em teias alimentares estreitamente dependentes de seu ambiente (KOCH *et al.*, 2014). O processo biológico de degradação completa dos compostos orgânicos biogás é conduzido por uma complexa rede de

microrganismos pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea envolvidos em associações especializadas em diferentes processos (CABEZAS *et al.*, 2015).

Pertencentes ao domínio Bacteria, os filos mais comumente encontrados são: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Cloacimonetes, Tenericutes, Spirochaetes, Aminicenantes, Chloroflexi e Parcubacteria. Enquanto ao domínio Archaea, os filos mais encontrados são: Euryarchaeota, Woesearchaeota, Bathyarchaeota e Crenarchaeota (CAMPANARO *et al.*, 2010; CALUSINSKA *et al.*, 2018).

As três primeiras fases do processo de DA (hidrólise, acidogênese e acetogênese) são realizadas por microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria, enquanto a última fase (metanogênese) é realizada por microrganismos do domínio Archaea (VRIEZE *et al.*, 2015).

A maioria das espécies de bactérias hidrolíticas pertencem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, enquanto a abundância dos filos Fibrobacter, Spirochaetes e Thermotogae é menos frequente, além disso os principais gêneros encontrados são: *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldanaerobacter*, *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Halocella* e *Eubacterium*. Quando comparadas às arqueas metanogênicas, crescem rapidamente e são menos sensíveis às mudanças de temperatura e pH (AZMAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018).

Entre os filos de bactérias acidogênicas predominantes destacam-se: Bacteriodetes, Cloroflexi, Firmicutes e Proteobacteria (AMIN *et al.*, 2021). Além disso, os principais gêneros encontrados são: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Ruminococcus* e *Paenibacillus* (CARUSO *et al.*, 2019; ARYAL *et al.*, 2018).

Os principais gêneros de bactérias acetogênicas são *Pelotomaculum*, *Smithllela* e *Syntrophobacter*, comumente encontrados na biodegradação de propionatos, e *Syntrophomonas*, que utilizam butirato (CARUSO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018).

Os gêneros mais comuns de arqueas em reatores de biogás são *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (LIU *et al.*, 2009; KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014). Apresentam lento desenvolvimento e alta sensibilidade às mudanças ambientais que podem afetar o tamanho e/ou desempenho da população e reduzir a eficácia da produção de biogás (YOUNGSUKKASEM *et al.*, 2013).

A proporção da composição taxonômica de microrganismos em reatores anaeróbios pode variar a depender das configurações do reator e do tipo de biomassa (substrato) utilizado (ABENDROTH *et al.*, 2018). O monitoramento e/ou avaliação da microbiota pode ser realizado pela identificação de táxons, genes, transcritos, proteínas e metabólitos ou pela caracterização da comunidade microbiana como uma entidade coerente pela técnica de *fingerprint* (VRIEZE, 2020).

#### 2.6 Consórcios microbianos

Na natureza, as células microbianas quase nunca estão sozinhas e quase sempre vivem adjacentes a parentes ou espécies diferentes, cujas interações estão intimamente relacionadas à viabilidade, atividade e estrutura da comunidade microbiana (MOULD; HOGAN, 2021). Além disso, apresentam diferentes relações ecológicas: neutralismo, mutualismo, comensalismo, amensalismo, predação e competição (ROELL *et al.*, 2019).

Os papéis funcionais de microrganismos-chave da microbiota atuante no ciclo da matéria e fluxo de energia é de grande interesse para aprimorar abordagens de engenharia, possibilitando o gerenciamento sustentável sistemas experimentais e a extração de novos conhecimentos sobre microbiomas (WEI et al., 2020; LAWSON et al., 2019).

Embora o cultivo axênico de culturas bacterianas seja utilizado na tecnologia de fermentação, o uso de consórcios bacterianos apresenta maior vantagem devido à combinação da capacidade metabólica que oferecem para a utilização de substratos mais complexos e a produção de produtos específicos (DU *et al.*, 2020).

Segundo Bathia *et al.* (2018), os consórcios microbianos são classificados em naturais, artificiais, semi-sintéticos e sintéticos, conforme pode ser observado em detalhes no Quadro 1.

Quadro 1 – Classificação dos consórcios microbianos.

Classificação	Definição	
Consórcio microbiano natural	Refere-se a um grupo de microrganismos que	
	vivem em simbiose na natureza.	
Consórcio microbiano artificial	Refere-se a diferentes microrganismos de origem natural capazes de crescer em simbiose que são usados juntos em um sistema fechado para produzir produtos valiosos.	
Consórcio microbianos semisintético	Refere-se a microrganismos de origem natural e modificados que são cultivados juntos para atingir um objetivo comum.	
Consórcio microbiano sintético	Refere-se a co-cultura de microrganismos que são metabolicamente modificados para melhorar sua função e produtividade.	

**Fonte:** Bathia *et al.* (2018).

Os consórcios bacterianos são, portanto, uma atraente opção para o tratamento de resíduos sólidos orgânicos, permitindo a recuperação de recursos na forma de energia por meio da digestão anaeróbia (WAINAINA *et al.*, 2020). As tecnologias de biogás normalmente

aplicam consórcios microbianos anaeróbios naturais que formam uma intrincada cadeia alimentar microbiológica (KOVÁCS *et al.*, 2013).

Projetar estratégias baseadas em microrganismos para gerenciar reatores anaeróbios, exige entender o seu desempenho em estado estacionário e reação a distúrbios operacionais ou ambientais. Essas informações estão disponíveis em maior número para o domínio Arquea que para o domínio Bacteria (CARBALLA; CARBALLA; REGUEIRO; LEMA, 2015). Além disso, os microrganismos de um consórcio devem crescer em harmonia sob as mesmas condições: temperatura, pH, oxigênio e meio de cultivo (ROELL *et al.*, 2019).

Uma vez que fatores determinísticos (seleção natural e interações ecológicas) e estocásticos (nascimento, colonização, especiação e morte) afetam o desenvolvimento da comunidade microbiana, a compreensão de sua montagem é crucial para sua gestão e manutenção em sistemas de produção de biogás (PAGALING *al.* 2014; ZHOU *et al.* 2013).

Cada grupo microbiano tem características únicas em resposta às variações operacionais, taxa de crescimento, densidade e diversidade, por isso é importante construir comunidades bacterianas e arqueanas altamente adaptadas à possíveis inibições do processo de digestão anaeróbia (TYAGI *et al.*, 2021; BELOSTOTSKIY *et al.*, 2015).

#### 2.6.1 Bioaumentação

Variando de aplicações a exploração de microrganismos tem se mostrado uma abordagem competitiva em sistemas de produção atuais podendo oferecer plataformas eficientes para recuperação de recursos (PINTO *et al.*, 2021).

Uma técnica biológica comum é bioaumentação que consiste em introduzir microrganismos ou enzimas específicos em um sistema para otimizar estágios do processo (PATEL et al., 2021; OZBAYRAM et al., 2017).

Entre os vários critérios para selecionar microrganismos certos para bioaumentação está sua capacidade de realizar a atividade biológica alvo em condições compatíveis (substrato, pH e temperatura) (CAYETANO *et al.*, 2021).

Gopinath *et al.* (2014) isolaram bactérias hidrolíticas de esterco bovino para construção de quatro consórcios com diferentes proporções de cada espécie. A bioaumentação dos consórcios ocorreu em quatro reatores tratando excremento de aves por 30 dias, em que a maior produção de biogás apresentou 79,45% de metano.

Tsapekos *et al.* (2017) aplicaram micróbios hidrolíticos (*Clostridium thermocellum* e *Melioribacter roseus*) no tratamento de resíduos agrícolas em reatores de tanque agitado em

batelada e continuamente (CSTRs). Os resultados dos ensaios em lote mostraram que *C. thermocellum* aumentou o rendimento de metano em 34% e no estado estacionário o efeito foi de 7,5%. Na bioaumentação com *M. roseus*, o rendimento de metano aumentou em até 10% em lote e nenhum efeito foi mostrado no CSTR.

Zhang, S. *et al.* (2018) realizaram a bioaumentação de espécies exoeletrogênicas de *Geobacter sulfurreducens* para acelerar a metanogênese. Testes em lote de produção de metano foram realizados utilizando acetato, o precursor mais típico da metanogênese, como substrato. A taxa máxima de produção de metano foi aumentada em 78%.

Poszytek *et al.* (2016) selecionaram e caracterizaram bactérias hidrolíticas (celulolíticas) para construção de um consórcio microbiano visando aumentar a produção de biogás a partir da degradação da silagem de milho. As cepas (16), isoladas de lodo de esgoto de uma usina de biogás agrícola, dejetos e esterco bonino, pertenciam aos gêneros *Bacillus*, *Providencia* e *Ochrobactrum*. O consórcio microbiano com alta atividade celulolítica, alta atividade de endoglucanase e ampla faixa de tolerância a condições físicas e químicas aumentou a produção de biogás em até 38%.

Mélo-Schlub et al., (2019) construíram um consórcio bacteriano hidrolítico com *Bacillus subtillis* e *Alcalingenes faecallis* isolados de resíduos sólidos urbanos em reator anaeróbio. O concórcio foi aplicado ao tratamento de RSU, lodo de esgoto e água durante 106 dias, em que a produção de metano foi de aproximadamente 66-70%.

Ozbayram *et al.* (2018) utilizaram três culturas hidrolíticas (celulolíticas) enriquecidas a partir rúmen de vaca e cabra e um reator de biogás tratando biomassa de sorgo. A bioaumentação ocorreu em reator mesofílico tratando palha de trigo operado por 30 dias. O maior rendimento de metano foi registrado em reatores com 6% de cultura de enriquecimento de rúmen de cabra, o que representou um aumento de 36% na produção de metano.

Liaquat *et al.* (2017) coletaram três fontes de inóculos: lodo de esgoto de uma estação de tratamento de águas residuais, esterco de bovino e lodo de reator anaeróbio tratando matéria orgânica. O potencial individual e a combinação dos três foram avaliados no tratamento de resíduos agrícolas e resíduos de hortaliças em quatro reatores, em que a maior produção de biogás apresentou 67,7% de metano.

Miura *et al.* (2015) utilizaram sedimentos marinhos para desenvolver a comunidade microbiana metanogênica e melhorar a produção de metano no tratamento de algas marrons sob alta salinidade. O tratamento em lote apresentou produção máxima de metano de 64,8%.

A síntese dos exemplos de bioaumentação de reatores descritos acima podem ser observados na Tabela 3.

 $Tabela\ 3-Bio aumentação\ aplicada\ ao\ processo\ de\ digestão\ anaer\'obia.$ 

Microrganismo(s)	Fonte(s)	Substrato(s)	Aumento de metano (%)	Referência
Bacillus subtillis Alcalinas faecallis	Reator tratando RSU	RSU, água e lodo de esgoto	66-70%	Mélo-Schlub et al., (2019)
Clostridium thermocellum Melioribacter roseus	Reator tratando dejetos suínos Campo de petróleo	Resíduos agrícolas	34% 10%	Tesapekos <i>et al.</i> (2017a) Tesapekos <i>et al.</i> (2017b) Azman <i>et al.</i> (2015)
Geobacter sulfurreducens	Células de combustível	Acetato	78%	Zhang, S. <i>et al.</i> (2018) Reguera <i>et al.</i> , (2006)
Bacillus Providencia Ochrobactrum	Lodo de reator Dejeto bovino Esterco bovino	Silagem de milho	38%	Poliszytek et al. (2016)
Enterobacterium cloacae Pseudomonasaeru aeruginosa Pseudomonas putida Bacillus subtilis Streptococcus bovi Streptococcus salivarius Clostridium tyrobutyricum Clostridium drakei Methanospirillum hungatei Methanotoccus voltaei Methanobrevibacter smithii Methanosarcina thermophila	Esterco bovino	Excrementos de aves	79, 45%	Gopinath <i>et al</i> . (2014)
Cultura enriquecida	Rúmen bovino Rúmen caprino Reator tratando sorgum	Palha de trigo	36%	Ozbayram et al. (2018)
Cultura enriquecida	Lodo de esgoto Esterco bovino Lodo de reator	Resíduos de agricultura e resíduos de hortaliças	67,7%	Liaquat <i>et al.</i> (2017)
Cultura enriquecida	Sedimento marinho	Alga marrom	64,8%	Miura et al. (2015)

#### 2.7 Parâmetros operacionais em reatores anaeróbios

O desempenho, a eficiência e a produtividade do DA dependem de variados fatores operacionais (SAHA *et al.*, 2020). A estrutura da comunidade microbiana nos processos de DA correlaciona-se com vários parâmetros de desempenho que podem ser controlados para facilitar o crescimento das comunidades microbianas centrais e permitir melhor eficácia de reatores (KHANAL *et al.*, 2021).

#### 2.7.1 Substrato

A composição do substrato abrange uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, constituindo um fator crucial para aumentar a quantidade de biogás no processo de DA (RASAPOOR *et al.*, 2020). A redução na quantidade de matéria seca do substrato, representada por sólidos totais e sólidos voláteis, indica a geração de biogás durante a conversão biológica da biomassa (ZHONG *et al.*, 2011).

Entre os principais substratos empregados como matérias-primas no processo de DA, destacam-se os resíduos de biomassa como: resíduos sólidos urbanos, resíduos de alimentares, resíduos agrícolas, resíduos florestais, esterco animal, lodo de esgoto, águas residuais industriais, dentre outros (AMBAYE *et al.*, 2021; SAWATDEENARUNAT *et al.*, 2015).

#### 2.7.2 Razão carbono/nitrogênio (C/N)

A relação carbono/nitrogênio (C/N) de um substrato é uma caracterização comumente relacionada aos nutrientes (MEEDOGA *et al.*, 2018) que em proporção ideal para os microrganismos permitem maximizar a produção de biogás. Valores de C/N entre 20 e 30 O são ideais para a estabilidades do processo de. Valores baixos de C/N elevam as concentrações de amônia, inibindo o crescimento microbiano, enquanto valores altos produzem grandes quantidades de ácidos graxos voláteis (SIDDIQUE; WAHID, 2018).

#### 2.7.3 Nutrientes

A composição equilibrada de micro e macronutrientes é necessária para a sobrevivência dos microrganismos envolvidos no processo de DA. Macronutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre são usados para o reforço da estrutura celular de biomassa; para a

síntese de proteínas; para capturar e transferir energia por transportadores nas atividades celulares; e o enxofre é necessário para o crescimento de metanógenos e como componente de alguns aminoácidos, respectivamente (MIRMOHAMADSADEGHI *et al.*, 2019).

Micronutrientes como ferro, níquel, zinco e cobalto são importantes para manter a atividade e aumentar o metabolismo microbiano e para sintetizar coenzimas essenciais relacionadas a metanogênese (LV *et al.*, 2021; KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014).

#### 2.7.4 Configurações do reator

Diferentes tipos e configurações de reatores foram desenvolvidos para utilizar uma ampla variedade de substratos e aumentar eficiência do processo de DA (ZHU *et al.*, 2018). Segundo Amaral, Steinmetz e Kunz (2019), os reatores mais usados no Brasil são: reator de lagoa coberta (BLC), reator em fase sólida (RFS), reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) e CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*).

Os detalhes de cada modelo de reator podem ser observados na Quadro 2.

Quadro 2 – Principais modelos de reatores utilizados no Brasil.

Características
É um tanque escavado no solo, impermeabilizado e coberto com material
geossintético caracterizado pela baixa permeabilidade a fluídos e gases.
Tem como característica o fluxo ascendente do afluente por uma manta de
lodo até o topo do reator, onde há um separador trifásico.
Caracterizado por ter seu conteúdo em homogeneização devido à presença
de sistema de agitação, suporta elevadas cargas orgânicas volumétricas.
São comuns com operação em batelada, sendo alimentados com resíduos
contendo entre 20 e 40% de sólidos.

Fonte: Adaptado por Amaral, Steinmetz e Kunz (2019).

#### 2.7.5 Inóculo

O inóculo fornece ao sistema de DA a população microbiana inicial (PELLERA; GIDARAKOS, 2016). Em reatores, os microrganismos são fornecidos na fase de inoculação, em que a seleção de uma fonte de inóculo que contenha grupos funcionais adequados, capazes de interagir entre si e de se adaptar às diversas condições ambientais é essencial para produção de biogás (PECES *et al.*, 2018; WOJCIESZAK *et al.*, 2017).

O uso de inóculos pode favorecer o crescimento de comunidades microbianas centrais, reduzir o tempo de inicialização de reatores e a instabilidade do sistema (TAO *et al.*, 2020;

KHANAL *et al.*, 2021). Para a inicialização de reatores, normalmente são usados como fontes de inóculos: lodo digerido de reatores, de estações de tratamento de águas residuais ou industriais, rúmen e estrume animal e cepas de microrganismos naturalmente ou artificialmente selecionadas (RAPOSO *et al.*, 2012; KHALID *et al.*, 2011).

#### 2.7.6 Temperatura

A temperatura exerce influência sobre a velocidade do metabolismo microbiano, uma vez que cada microrganismo possui uma faixa de temperatura ideal para realização de suas funções metabólicas, além de influenciar o equilíbrio de ionização, a solubilidade do substrato, dentre outros (ROOPNARAIN *et al.*, 2021; SPEECE, 1996).

Por influenciar na atividade bacteriana, mudanças de temperatura afetam a produção de biogás, sendo necessário controlar a temperatura constante para maior estabilidade do processo, que normalmente é operado em duas faixas de temperatura: mesofílica (20-40°C) e termofílica (>40°C) (JAIN *et al.*, 2015; EL-MASHAD *et al.*, 2004).

#### 2.7.7 pH

O pH influencia o desempenho dos microrganismos ao longo do processo e cada fase possui uma faixa de pH considerada ideal. Em reatores anaeróbios, está relacionado às concentrações de amônia, produzida pela degradação de proteínas, aminoácidos, ureia e pelos ácidos graxos voláteis, produzidos na etapa de acidogênese. Dessa forma, o controle da concentração adequada destes compostos é necessário para manter o equilíbrio do processo de DA (GAO *et al.*, 2021; FISGATIVA; TREMIER; DABERT, 2016).

Durante a DA a produção de biogás ocorre entre intervalo de pH de aproximadamente 6 a 8,5. Quando os limites dessas faixas de pH excedem, o processo é deteriorado, resultando em uma diminuição na produção de metano (KOUGIAS; ANGELIDAKI, 2018).

#### 2.7.8 Tempo de retenção hidráulica

O tempo de retenção hidráulica é o período necessário para a completa degradação da matéria orgânica. Está associado à taxa de crescimento microbiano, temperatura, carga orgânica e composição do substrato (SIDDIQUE; WAHID, 2018; MAO *et al.*, 2015).

# 3 METODOLOGIA

O desenvolvimento dos experimentos foi realizado nas estruturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

# 3.1 Origem dos microrganismos

# 3.1.1 Caracterização da área

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram isolados de sedimento proveniente de reservatório urbano, Açude Santo Anastácio (ASA), localizado no Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC) em Fortaleza, Ceará.

A localização do açude Santo Anastácio pode ser observada na Figura 1.

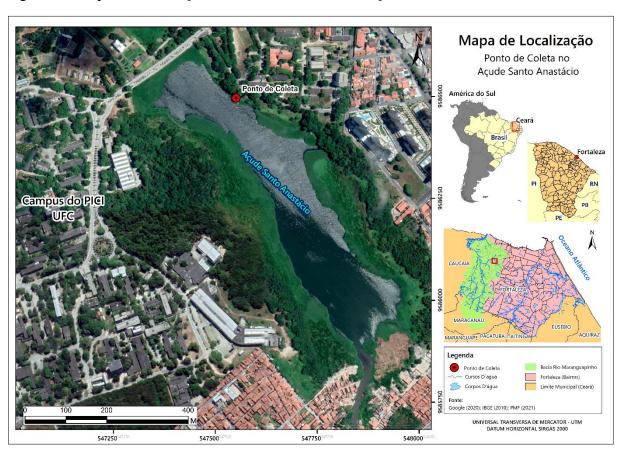


Figura 1 – Mapa de localização do reservatório urbano: Açude Santo Anastácio.

**Fonte:** Autor (2021).

Fortaleza situa-se entre as coordenadas 3°43'02" Sul de latitude e 38°32'35" Oeste de longitude e apresenta como características ambientais, localização em região costeira, clima Tropical Quente Subúmido com precipitação média anual de 1.378 mm, predominante no período de janeiro a maio, e temperatura média entre 26 e 28°C (IPECE, 2021).

O reservatório, pertencente a bacia hidrográfica do rio Maranguapinho, está localizado a 3°44′36″ Sul de latitude e 38°34′13″ Oeste de longitude, possuindo como afluente um canal de drenagem urbana alimentado a montante pela lagoa da Parangaba. Estes corpos hídricos estão inseridos em uma área com alta urbanização e baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) que contribuem para a poluição das águas por meio do despejo de resíduos sólidos e esgoto não tratado oriundos das habitações do entorno (FRAGA; ROCHA; LIMA NETO, 2020; ARAÚJO; LIMA NETO; BECKER, 2019).

## 3.1.2 Amostragem do sedimento

O ponto escolhido para a coleta de sedimento foi uma área com águas paradas, em que a disponibilidade de oxigênio (O<sub>2</sub>) tende a ser menor, para aumentar a probabilidade de isolar bactérias anaeróbias facultativas, capazes de sobreviver na presença e ausência de oxigênio sem sofrer efeitos deletérios na realização de suas atividades metabólicas.

A amostragem do sedimento foi realizada utilizando coletor de solo, em profundidade de aproximadamente 1 metro, próximo à margem, entre as coordenadas 3°44'27.3" Sul de latitude e 38°34'18.3" Oeste de longitude. Em seguida, a amostra foi acondicionada em saco de PVC com fechamento, armazenada em caixa térmica e transportada ao LAMAP.

Um esquema das etapas da coleta do sedimento pode ser observado na Figura 2.

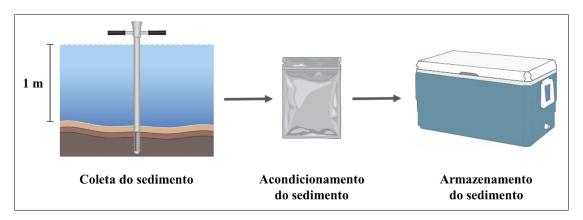


Figura 2 – Fluxograma do procedimento amostragem de sedimento em corpo hídrico.

Fonte: Autor (2021).

#### 3.2 Processamento da amostra

Em laboratório, foram adicionados 25 g da amostra de sedimento em erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina 0,85%, previamente esterilizados, e colocados em agitador magnético por 30 minutos para homogeneização. Em seguida, a mistura homogeneizada foi deixada em repouso por 10 minutos para decantação dos grânulos de sedimento e obtenção do sobrenadante.

Na Figura 3, observa-se as etapas do processamento da amostra em laboratório.

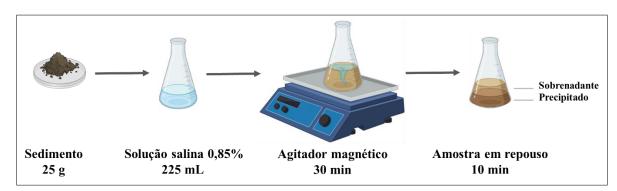


Figura 3 – Fluxograma do processamento da amostra de sedimento em laboratório.

**Fonte:** Autor (2021).

### 3.3 Quantificação das colônias microbianas viáveis

A quantificação do número de bactérias anaeróbias cultiváveis foi realizada por meio do método de Contagem Padrão em Placas de acordo Madigan *et al.* (2016), com adaptações, para os grupos bacterianos funcionais de bactérias heterotróficas cultiváveis (controle), bactérias hidrolíticas e bactérias acidogênicas.

Pela técnica de semeadura por *Spread Plate* foram realizadas diluições decimais seriadas,  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , exceto grupo controle ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), em que uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi diluída em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,85%. Em seguida, 0,2 mL da mistura foram inoculados em placas de petri, em duplicada, contendo meio de cultura específico para cada grupo bacteriano funcional, espalhados com alça de Drigalski estéril e incubadas em jarras de anaerobiose a 28°C por 48 horas para crescimento, com exceção das cepas amilolíticas e acidófilas, que permaneceram em incubação pelo período de 7 dias.

Os procedimentos realizados na semeadura podem ser observados na Figura 4.

Diluição 10-1

1mL

0,2mL

Diluição 10-2

1mL

Diluição 10-3

Solução salina
0,85%

Inoculação em meio de cultura

alça de Drigaski

Jarra de anaerobiose Crescimento
28°C entre 48h e 7 dias

Figura 4 – Fluxograma da semeadura pela técnica de *Spread Plate*.

Após o período de crescimento, as colônias dos diferentes grupos bacterianos funcionais foram quantificadas, considerando as placas que apresentaram valores de contagens entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC).

Foram utilizados os meios de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA) para as bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC), Ágar Nutriente + 5% de leite desnatado para as bactérias proteolíticas (BP) (SIZEMORE; STEVENSON, 1970), Ágar TSA + 1% de óleo de soja, com adaptações, para bactérias lipolíticas (BL) (LIUXY; LEE; CHEN, 1996), TSA (10%) + 1% de amido de milho para as bactérias amilolíticas (BAm) (MARIANO; SILVEIRA, 2005) e Ágar Ágar + Glicose + Selenito de sódio + Azul bromatimol para as bactérias acidogênicas (BAc) (YOUSEF; HEJAZI; ALLAHVERDI, 2013).

## 3.4 Isolamento das colônias microbianas

O isolamento das cepas bacterianas foi realizado pela seleção das UFCs que apresentaram morfologias diferenciadas (tamanho, forma, cor, consistência), que foram repicadas com agulha de platina, em tubos de ensaio contendo meio de cultura não seletivo, Ágar TSA, e incubadas em estufa bacteriológica à 35°C por 24 horas para crescimento.

Os procedimentos realizados durante o isolamento podem ser observados na Figura 5.

Isolamento bacteriano Inoculação em Ágar TSA Estufa bacteriológica 35°C por 24h

Figura 5 – Fluxograma do isolamento bacteriano.

No total, foram isoladas 60 cepas bacterianas, sendo 10 de bactérias heterotróficas cultiváveis (controle), 30 de bactérias hidrolíticas, subdividadas em proteolíticas (10), lipolíticas (10) e amilolíticas (10), e 20 de bactérias acidófilas, todas nomeadas com sigla (BHC, BP, BL, BAm e BAc) e números em ordem crescente.

# 3.5 Caracterização morfotintorial

A caracterização fenotípica foi realizada pela técnica de coloração de Gram, de acordo com Fuke, Case e Tortora (2017). A coloração adquirida pelas bactérias quando submetidas a agentes químicos específicos permite caracterizá-las quanto a morfologia, em cocos e bastonetes, e estrutura da parede celular, em Gram-positivas e Gram-negativas.

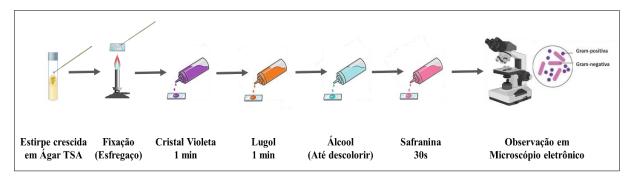
Para realização do procedimento de coloração, os isolados bacterianos foram renovados em Ágar TSA e incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas para crescimento. Em seguida, foram esfregados em lâmina microscópica com alça de níquel, fixadas pelo calor sob bico de Bunsen e submetidas a coloração de Gram.

A lâmina contendo o esfregaço fixado foi submergida em corante cristal violeta por 1 minuto, para coloração da parede celular, e lavada em água corrente. Em seguida, foi submergida em lugol por 1 minuto para a fixação do corante na parede celular. Depois, foi submergida rapidamente em álcool, contra-corante, para remoção do cristal violeta e lugol da parede celular das bactérias Gram-negativas, deixando-as descoradas, enquanto as bactérias Gram-positivas os mantêm na parede celular, permanecendo coradas. Por último, foi submergida em corante safranina por 30 segundos, para a coloração da parede celular das bactérias Gram-negativas, e lavado em água corrente.

Após a coloração, as lâminas microscópicas, contento os esfregaços bacterianos corados, foram observadas em microscópio eletrônico para caracterização morfotintorial.

Os procedimentos da coloração de Gram podem ser observados na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma do procedimento de coloração de Gram.



Fonte: Autor (2021).

### 3.6 Teste de oxidação e fermentação (OF)

O teste de oxidação e fermentação (OF) da glicose foi realizado de acordo com Faddin (1980), com adaptações, com a finalidade de identificar a via metabólica de consumo da glicose e selecionar bactérias anaeróbias facultativas.

Os testes de seleção não foram realizados para o grupo controle (BHC), visto que eram de interesse apenas as 50 cepas bacterianas pertencentes aos grupos funcionais: BL, BP, BAm e BAc. Entretanto, das 50 cepas hidrolíticas e acidogênicas, foram utilizadas apenas 46 devido a ocorrência de imprevistos durante o estudo. O resultado positivo de cada teste foi utilizado como pré-requisito para as análises seguintes.

# 3.6.1 Teste de OF para bactérias Gram-negativas

Para a realização do teste, as cepas bacterianas foram renovadas em Ágar TSA e incubadas em estufa bacteriológica à 35°C por 24 horas para crescimento. Em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Hugh e Leifson, meio base OF, com glicose, em duplicata. Em um dos tubos foi acrescido 1 mL de óleo mineral, para criação de condição anaeróbia. Em seguida, foram incubadas a 35°C pelo período entre 24 horas a 14 dias.

Após o período de incubação, o resultado do teste foi aferido, em que o amarelamento do meio de cultura com e sem óleo mineral indicava a via metabólica das bactérias.

Os procedimentos do teste de OF da glicose podem ser observados na Figura 7.

Não oxidação
Não fermentação

Oxidação
Não fermentação

Estirpe crescida
em Ágar TSA
meio base O/F

Stufa bacteriológica
35°C entre 24h e 14 dias

Oxidação
Fermentação

Figura 7 – Fluxograma do teste de OF para bactérias Gram-negativas.

# 3.6.2 Teste de OF para bactérias Gram-positivas

Para a realização do teste, as cepas bacterianas foram renovadas em Ágar TSA e incubadas em estufa bacteriológica à 35°C por 24 horas para crescimento. Em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Staph OF, com glicose, em duplicata. Em um dos tubos foi acrescido 1 mL de óleo mineral, para criação de condição anaeróbia. Em seguida foram incubadas a 35°C pelo período entre 24 horas a 14 dias.

Após o período de incubação, o resultado do teste foi aferido, no qual o amarelamento do meio de cultura com e sem óleo indicava a capacidade das bactérias em oxidar e/ou fermentar a glicose, sendo consideradas anaeróbias facultativas.

Os procedimentos do teste de OF podem ser observados na Figura 8.

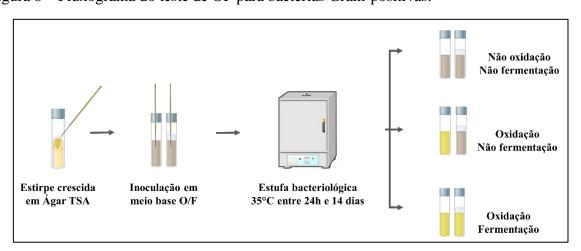


Figura 8 – Fluxograma do teste de OF para bactérias Gram-positivas.

**Fonte:** Autor (2021).

#### 3.7 Testes de sobrevivência bacteriana

Os testes de sobrevivência foram realizados para 42 cepas que apresentaram resultado positivo no teste de OF com a finalidade de analisar a capacidade de resistência à condições ambientais adversas.

## 3.7.1 Teste de sobrevivência em diferentes temperaturas

O teste de sobrevivência à diferentes faixas de temperatura foi realizado com a finalidade de analisar a capacidade de termorresistência das cepas bacterianas.

Para a realização do teste, as cepas bacterianas foram renovadas em Ágar TSA e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Em seguida, foram inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas separadamente a 40 e 45°C em banho maria por 48 horas para crescimento.

Após o período de incubação, o resultado do teste foi observado, no qual a turvação do meio de cultura, causado pelo crescimento bacteriano, indicava a sobrevivência da cepa a condição térmica submetida.

Os procedimentos do teste de termorresistência podem ser observados na Figura 9.

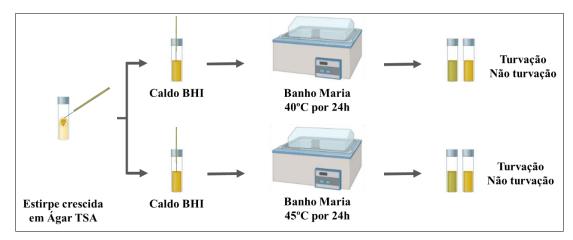


Figura 9 – Fluxograma da análise de termorresistência bacteriana.

**Fonte:** Autor (2021).

# 3.7.2 Teste de sobrevivência em diferentes faixas de pH

Para a realização do teste, as cepas bacterianas foram renovadas em Ágar TSA e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Em seguida, foram inoculadas

separadamente em caldo BHI, com pH ajustado para as faixas 5,0 e 6,0, e incubadas a 35°C em estufa bacteriológica por 24 horas para crescimento.

Após o período de incubação, o resultado do teste foi verificado, no qual a turvação do meio de cultura, causado pelo crescimento bacteriano, indicava a sobrevivência da cepa a condição de acidez submetida.

Na Figura 10 observa-se os procedimentos do teste de sobrevivência em faixas de pH.

Caldo BHI pH 5

Estirpe crescida em Ágar TSA

Caldo BHI pH 6

Estufa bacteriológica 35°C por 24h

Figura 10 – Fluxograma do teste de sobrevivência em diferentes faixas de pH.

Fonte: Autor (2021).

#### 3.8 Teste de antagonismo bacteriano

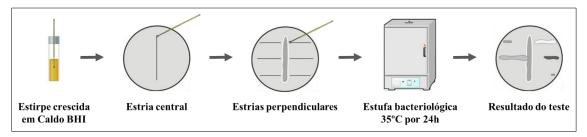
O teste de antagonismo bacteriano foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Garré (1887), utilizando a técnica de estrias cruzadas, *Cross streak*, com adaptações, com a finalidade de selecionar bactérias capazes de crescer em sinergia. Foram submetidas ao teste 20 cepas bacterianas que apresentaram resultados positivos aos testes de sobrevivência.

Para realização do teste, as bactérias foram renovadas em caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica à 35°C por 24 horas para crescimento. Em seguida, um inóculo com a cepa potencial inibidora foi estriado verticalmente no centro de placa de Petri contendo Ágar TSA, meio de cultura não seletivo, e inóculos com as cepas testadas foram estriados perpendicularmente a distância de 0,5 cm. Após o estriamento, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para crescimento em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, o resultado do teste foi analisado, em que a identificação da atividade antagônica foi considerada positiva (+), quando detectada a inibição do crescimento das cepas com a presença de halos, e negativa (-), quando detectado crescimento com as cepas sobrepostas, sem inibição do crescimento próximo a cepa central.

Os procedimentos do teste de antagonismo podem ser observados na Figura 11.

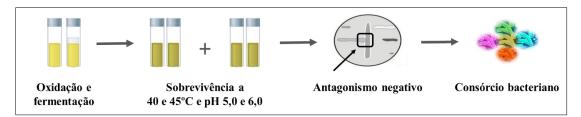
Figura 11 – Fluxograma do teste de antagonismo bacteriano.



## 3.9 Formação dos consórcios bacterianos

Os consórcios bacterianos foram formados a partir da análise dos resultados obtidos nos testes anteriores. Foram selecionadas as cepas bacterianas que atenderam aos seguintes critérios: capacidade de oxidar e fermentar a glicose, capacidade de sobrevivência a diferentes condições de temperatura e pH e atividade antagônica negativa, conforme a Figura 12.

Figura 12 – Critérios de seleção para formação de consórcios.



**Fonte:** Autor (2021).

Os critérios tiveram a finalidade de possibilitar o manuseio das cepas bacterianas em condições normais de laboratório, a sobrevivência do consórcio em todas as fases da DA e as possíveis variações operacionais de reatores anaeróbios, e o desenvolvimento de suas atividades metabólicas em condições harmônicas de sinergia.

### 3.10 Formação do inóculo bacteriano

A formação do inóculo foi realizada por meio do encapsulamento dos consórcios em macropérolas, obtidas a partir da concentração da biomassa bacteriana, seguida de imobilização pela técnica de encapsulação, utilizando o método de extrusão. Foram formados dois inóculos de dois consórcios, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, compostos pelas cepas P3+Am7+Ac14 e P3+Am7+Ac15, respectivamente.

#### 3.10.1 Concentração da biomassa bacteriana

A concentração da biomassa bacteriana (*pellet*) dos consórcios selecionados, necessária para a imobilização, foi realizada de acordo com Sheu e Marshal (1993), com adaptações.

Para a concentração do *pellet*, as cepas formadoras dos consórcios bacterianos foram renovadas em Ágar TSA e incubadas em estufa bacteriológica à 35°C por 24 horas. Depois, foram inoculadas em solução salina 0,85% e ajustadas à escala de McFarland (0,5 nm), com a finalidade de atingir a concentração celular igual a 1,5x10<sup>8</sup> UFC/mL.

Alíquotas de 1 mL de cada cepa bacteriana foi inoculada em erlenmeyer contendo 200 mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubadas a 30°C por 24 horas em agitador shaker para crescimento dos consórcios. Em seguida, a concentração celular foi medida em espectrômetro e ambos foram transferidos para tubos *Falcon* e centrifugados a 500 RPM em 21°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado em experimentos seguintes.

Os procedimentos de obtenção do *pellet* podem ser observados na Figura 13.

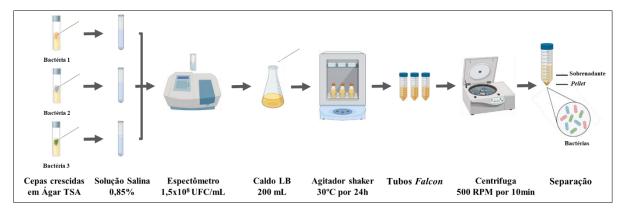


Figura 13 – Fluxograma do processo de obtenção do *pellet*.

Fonte: Autor (2021).

#### 3.10.2 Encapsulação da biomassa bacteriana

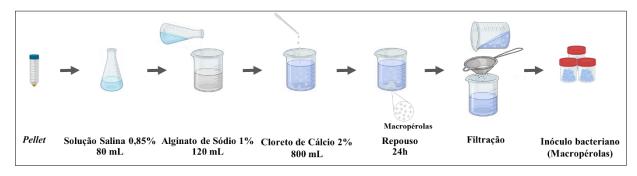
A encapsulação do *pellet* foi realizada por meio de imobilização em matriz de alginato de sódio pelo método de extrusão de acordo com Rathore *et al.* (2013), com adaptações.

Primeiro, o *pellet* foi ressuspendido em erlenmeyer contendo 80 mL de solução salina 0,85% transferido para becker contendo 120 mL de alginato de sódio 1%. Após homogeneização, pelo método de extrusão utilizando pipeta *Pasteur*, foram transferidos para becker contendo 800 mL de solução gelificante de cloreto de cálcio 2%. A reação obtida pela mistura das soluções resultou no encapsulamento das células pela formação de macropérolas.

As pérolas permaneceram em solução de cloreto de cálcio 2% por 24 horas e foram separadas por filtração, utilizando peneira com malha de 60 µm e água destilada estéril para lavagem. Em seguida, foram armazenadas em frascos estéreis para uso em testes posteriores.

Os procedimentos de encapsulação podem ser observados na Figura 14.

Figura 14 – Fluxograma do processo de encapsulamento bacteriano.



**Fonte:** Autor (2021).

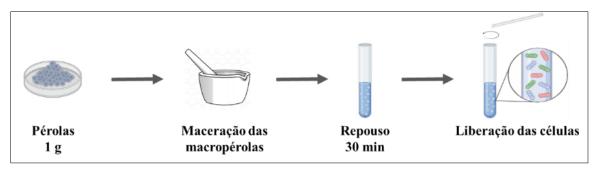
# 3.10.3 Teste de reativação e quantificação da biomassa encapsulada

O teste de reativação da biomassa bacteriana encapsulada foi acordo com Sheu e Marshau (1993), com adaptações, com a finalidade de verificar a sobrevivência das cepas bacterianas ao procedimento de encapsulação.

Para a reativação da biomassa encapsulada, 1 g de pérola de cada inóculo encapsulado foi macerado e inoculado em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,85%, equivalente a diluição 10<sup>-1</sup>, e deixado em repouso para reidratação por 30 minutos. Em seguida, para a liberação das células, foi feito o rompimento das pérolas por meio da homegeneização da mistura utilizando bastão de vidro.

Os procedimentos de reativação das células podem ser observados na Figura 15.

Figura 15 – Fluxograma da reativação das células bacterianas.



**Fonte:** Autor (2021).

A quantificação do número de colônias viáveis foi realizada pelo método de Contagem Padrão em Placas (CPP), de acordo Madigan *et al.* (2016). Após a homogeneização, foram realizadas diluições seriadas (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup>) e pela técnica de semeadura por disseminação, *Pour Plate*, uma alíquota de 1 mL das diluições foram inoculadas em placas de petri, em duplicada, seguida da adição de 20 mL de Ágar TSA fundido. As placas foram homogeneizadas e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48 horas para crescimento.

Os procedimentos realizados na semeadura podem ser observados na Figura 16.

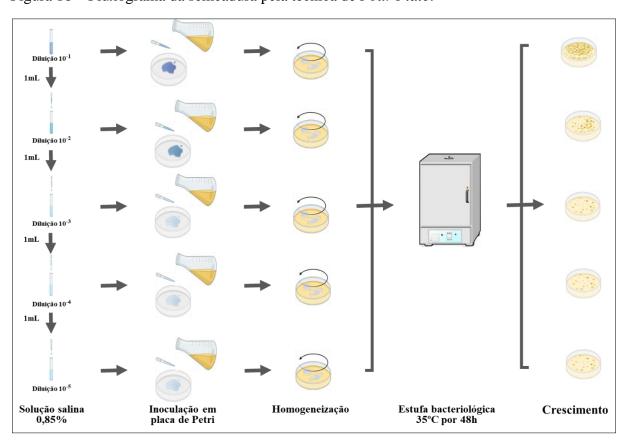


Figura 16 – Fluxograma da semeadura pela técnica de Pour Plate.

**Fonte:** Autor (2021).

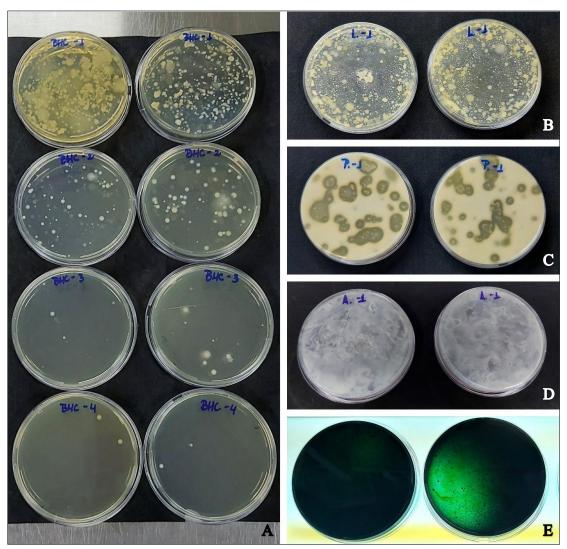
Após o período crescimento em estufa bacteriológica, as colônias crescidas foram quantificadas, considerando as placas que apresentaram valores de contagens entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC).

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 4.1 Contagem das colônias microbianas viáveis

O crescimento das colônias pertencentes aos diferentes grupos funcionais bacterianos após o processamento da amostra de sedimento pode ser observado na Figura 17, em que é possível ver as UFCs crescidas sobre cada meio de cultura seletivo, correspondendo as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  (BHC) e  $10^{-1}$  (BP, BL, BAm, BAc).

Figura 17 – Crescimento das colônias bacterianas após o processamento da amostra de sedimento proveniente do Açude Santo Anastácio (ASA).



**Fonte:** Autor (2021).

A: Bactérias heterotróficas cultiváveis; B: Bactérias lipolíticas; C: Bactérias proteolíticas; D: Bactérias amilolíticas; E: Bactérias acidogênicas.

O estudo da abundância e diversidade microbiana é importante para compreender a participação dos microrganismos no ciclo de nutrientes, fluxo de energia e destinação de contaminantes em ecossistemas complexos (CLINTON *et al.*, 2020).

Na Tabela 4 pode ser observada a quantificação do número de células viáveis de cada grupo funcional bacteriano, expressa em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

Tabela 4 – Quantificação das unidades formadoras de colônias de sedimento do ASA.

Grupos bacterianos	Unidade	População microbiana
ВНС		$1,2\times10^4$
$\mathbf{BL}$		-
BP	UFC/g	$5,0\times10^{2}$
BAm	C	· -
BAc		<10

**Fonte:** Autor (2021).

(-): incontável; (<): menor que.

As BHC apresentaram maior número de células viáveis totais (1,2×10<sup>4</sup> UFC/g) em relação aos grupos funcionais BP (5,0×10<sup>2</sup> UFC/g) e BAc (<10 UFC/g). O meio de cultura não seletivo utilizado para as BHC permite o crescimento de diferentes grupos bacterianos, o que explica o maior crescimento de células (COWAN; SMITH, 2017). Os grupos BL e BAm apresentaram crescimento significativo, entretanto não foi possível quantificar as colônias porque a homogeneização da cultura após o processamento dificultou a contagem.

A determinação de grupos bacterianos heterotróficos em ecossistemas dulcícolas possui importância devido à sua atuação na ciclagem de matéria e energia (KIRCHMAN; YU; COTTRELL, 2003), em que fatores ambientais formam hábitats intrínsecos que influenciam na composição da comunidade microbiana, suas preferências ecológicas e distribuição desde a zona pelágica à bentônica (YADAV *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2013).

A microbiota de sedimento de fundo possui bactérias com propriedades bioquímicas diversas que atuam em processos biogeoquímicos e que são amplamente distribuídas e que tem diversidade e abundância variáveis (YI *et al.*, 2021; KONIECZNA *et al.*, 2011). Em reservatórios, a decomposição da matéria orgânica pela comunidade microbiana leva à produção de gases como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) (DEEMER *et al.*, 2016). Para a degradação da matéria orgânica, é necessária a produção de enzimas hidrolíticas (KÄHKÖNEN; HAKULINEN, 2012) e a velocidade de degradação dependerá de fatores bióticos, como a capacidade enzimática da comunidade microbiana, e abióticos, como temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio (O<sub>2</sub>) (BIANCHINI JUNIOR *et al.*, 2014).

Desta forma, microrganismos provenientes de ecossistemas aquáticos têm atraído atenção devido ao seu potencial biotecnológico com aplicação na produção de produtos de valor agregado (YADAV *et al.*, 2019). A produção de enzimas hidrolíticas (proteases, lipases, amilases e outras) (MUDRYK; PODGORSKA, 2006) podem ter eficácia na otimização do tratamento de resíduos orgânicos em reatores anaeróbios para produção de energia na forma biogás, uma vez que bactérias e enzimas são cruciais na digestão anaeróbia (CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014).

#### 4.2 Características morfotintoriais

O resultado da caracterização fenotípica dos isolados bacterianos, quanto a morfologia e estrutura da parede celular, pode ser observado em detalhes na Quadro 3.

Quadro 3 – Classificação da morfologia e parede celular dos isolados de sedimento do ASA.

Classificação	Grupo funcional bacteriano								
Classificação	BHC	BHC BL BP		BAm	BAc				
Cocos, G+	*	*	*	*	Ac9				
Bastonetes,	B1, B8,	L3, L4,	P3, P5,	*	*				
G+	B9, B10	L8, L9	P9, P10	•	·				
Bastonetes, G-	B2, B4, B7	L1, L2,	P1, P2,	Am1, Am2, Am3, Am4,	Ac1, Ac2, Ac3, Ac4, Ac5, Ac6, Ac7, Ac8, Ac10,				
		B2, B4, L5, L6,		Am5, Am6,	Ac11, Ac12, Ac13, Ac14,				
		L7, L10	P7, P8	Am7, Am8, Am9, Am10	Ac15, Ac16, Ac17, Ac18, Ac19, Ac20				
VMNC	B3, B5, B6	*	*	*	*				

**Fonte:** Autor (2021).

G+: Gram positiva; G-: Gram negativa; VMNC: viável, mas não cultivável; \*: nenhuma cepa.

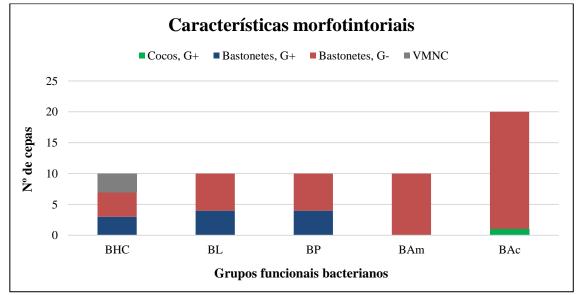
As bactérias apresentam morfologia bastante diversificada (TEESELING; PEDRO; CAVA, 2017), em que a parede celular exerce grande influência no formato das células (HAYHURST *et al.*, 2008), que, normalmente, são encontradas nas formas de esferas (cocos) e bastões (bastonetes) (YANG; BLAIR; SALAMA, 2016).

A parede celular bacteriana, localizada externamente à membrana citoplasmática, é composta por uma estrutura de peptideoglicano organizada em várias camadas, em bactérias Gram-positivas, ou em monocamada, em bactérias Gram-negativas (EGAN; ERRINGTON; VOLLMER, 2020). Sua estrutura é suficientemente flexível, para permitir o ajuste da forma bacteriana e de propriedades mecânicas, durante o crescimento e diferenciação, e resistente,

para proporcionar estabilidade a pressão osmótica causada pelos solutos dissolvidos do citoplasma e aos impactos adversos do ambiente (MAYER *et al.*, 2019).

As informações contidas do Quadro 3 estão sintetizadas no Gráfico 2, em que se observa o agrupamento das cepas bacterianas de acordo com a classificação morfotintorial.

Gráfico 2 – Características morfotintoriais dos isolados bacterianos provenientes de sedimento do ASA, de acordo com os grupos funcionais.



**Fonte:** Autor (2021).

Os microrganismos isolados são bactérias heterotróficas cultiváveis pertencentes aos grupos funcionais hidrolítico e acidogênico. Entre as dez (10) cepas isoladas do grupo BHC, utilizado como controle, sete (7) eram bastonetes, quatro (4) Gram-positivas e três (3) Gramnegativas, e as demais (3) eram viáveis, mas não cultiváveis (VMNC).

Na caracterização dos isolados do meio de cultura para BL, houve predominância de bastonetes (10), em que quatro (4) eram Gram-positivos e seis (6) eram Gram-negativos. Entre os isolados do meio de cultura para BP, também houve predomínio de bastonetes (10), sendo quatro (4) Gram-positivos e seis (6) Gram-negativos. E os isolados do meio de cultura para BAm apresentaram totalidade de bastonetes (10) Gram-negativos.

No grupo dos isolados do meio de cultura para BAc, os isolados eram bastonetes (19), com dominância Gram-negativos (18) e um (1) Gram-positivo.

O resumo do percentual de distribuição dos isolados bacterianos quanto às características morfotintoriais pode ser observado no Gráfico 3.

Características de parede celular

Gram-positivas Gram-negativas VMNC

5%

20%

Gráfico 3 – Agrupamento das cepas bacterianas provenientes de sedimento do ASA quanto à estrutura da parede celular.

A partir da análise do gráfico, observa-se maior percentual de bactérias Gram-negativas (75%), seguidas de Gram-positivas (20%) e VMNC (5%). Ambientes aquáticos apresentam predominância de bactérias Gram-negativas e pouca presença de bactérias Gram-positivas, o que explica o resultado obtido (SIGEE, 2005).

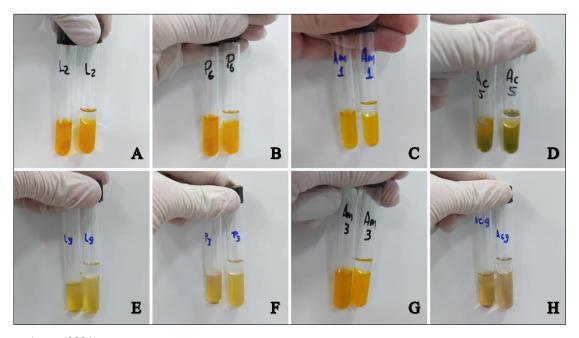
O não crescimento de algumas bactérias ocorre devido a limitação dos métodos de cultivo em criar condições favoráveis para o seu desenvolvimento em ambiente de laboratório (LEWIS *et al.*, 2021), uma vez que bactérias fastidiosas podem apresentar requisitos específicos de crescimento como: nutrientes, oxigênio, temperatura e pH (VARTOUKIAN, 2016). O não atendimento desses parâmetros pode fazer com que as bactérias entrem em estado de dormência, também conhecido "como viável, mas não cultivável", em resposta ao estresse associado (AYRAPETYAN; WILLIAMS; OLIVERC, 2018).

### 4.3 Via metabólica: oxidativa e/ou fermentativa

O teste de OF permite diferenciar bactérias de acordo com sua capacidade metabólica de utilização de uma fonte de carboidrato para obtenção de energia. O resultado do teste, aferido pela análise da cor do meio de cultura após o período de incubação, em que o amarelamento provocado pela mudança de pH, devido a produção de ácidos, permite identificar a via que o carboidrato foi metabolizado em condições aeróbia e anaeróbia (VERMELHO *et al.*, 2019).

O resultado do teste de OF de algumas cepas bacterianas pode ser observado na Figura 18, sendo considerado positivo (+) para o meio de cultura amarelado.

Figura 18 – Resultado do teste de OF realizado para cepas bacterianas de sedimento do ASA.

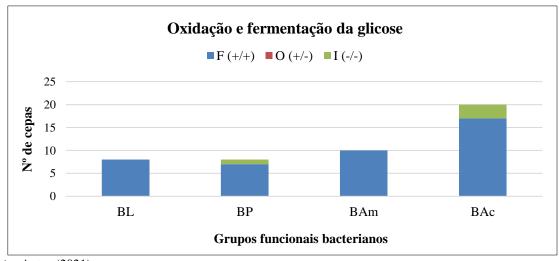


**Fonte:** Autor (2021).

A, E: bactérias lipolíticas; B, F: bactérias proteolíticas; C, G: bactérias amilolíticas; D, H: bactérias acidogênicas.

De acordo com a análise dos resultados do teste de OF, pode-se observar no Gráfico 4 a classificação das cepas bacterianas (46) quanto à capacidade de metabolizar a glicose.

Gráfico 4 – Agrupamento bacteriano quanto a via de oxidação e/ou fermentação da glicose.



**Fonte:** Autor (2021).

**F:** fermentativa; **O:** oxidativa; **I:** inerte.

A via pela qual a bactéria metaboliza a glicose, permite classificá-la em anaeróbia facultativa (F), aeróbia (O) ou inerte (N). Entre as cepas testadas, 43 foram capazes de oxidar e fermentar a glicose, sendo consideradas anaeróbias facultativas, e 3 permaneceram inertes.

A degradação de carboidratos por bactérias heterotróficas é um processo complexo que resulta na produção de compostos químicos de baixo peso molecular (DATE *et al.*, 2012). O mecanismo de oxidação e fermentação da glicose depende do papel desempenhado pela presença e ausência do oxigênio, respectivamente (HUGH; LEIFSON, 1953).

Os microrganismos convertem carbono e outras fontes de energia em produtos que possibilitem a manutenção de funções e crescimento (FOLCH; BISSCHOPS; WEUSTHUIS, 2021). A capacidade de culturas puras de metabolizar diversidades substanciais de substratos pode ser usada para caracterizá-las (KONOPKA; OLIVER; TURCO JUNIOR, 1998).

De acordo com a definição do chamado ponto de Pasteur, anaeróbios capazes de mudar seu metabolismo para aeróbio a pressão parcial de oxigênio (O<sub>2</sub>) próxima ao valor de 0,01 nível atmosférico atual são considerados anaeróbios facultativos (ŚLESAK *et al.*, 2019).

## 4.4 Sobrevivência bacteriana em diferentes condições ambientais

O resultado do teste de sobrevivência de algumas cepas bacterianas pode ser observado na Figura 19, em que a turvação do meio de cultura indica a sobrevivência da cepa.

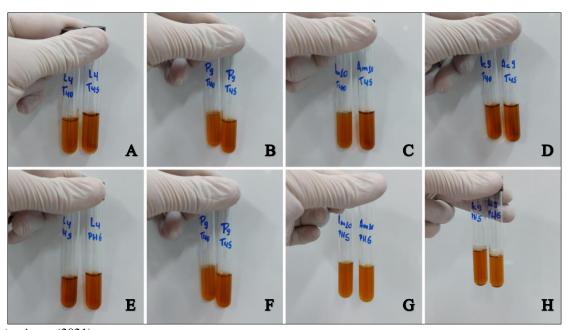


Figura 19 – Resultado do teste de sobrevivência (temperatura e pH) das cepas bacterianas.

**Fonte:** Autor (2021).

A, E: bactérias lipolíticas; B, F: bactérias proteolíticas; C, G: bactérias amilolíticas; D, H: bactérias acidófilas.

No Gráfico 5 observa-se o resultado do teste para todas as cepas bacterianas (40).

Sobrevivência bacteriana ■40°C ■45°C ■pH 5 ■pH 6 20 16 16 16 15 Nº de cepas 10 10 10 10 10 6 6 BL BP BAm BAc Grupos funcionais bacterianos

Gráfico 5 – Sobrevivência bacteriana em diferentes condições ambientais: temperatura e pH.

**Fonte:** Autor (2021).

Todas as oito (8) BL testadas sobreviveram sob temperatura de 40°C, enquanto somente seis (6) sobreviveram a 45°C. Para pH 5 e 6, sobreviveram seis (6) e sete (7) cepas bacterianas, respectivamente. No teste das BP (6), todas sobreviveram as temperaturas de 40°e 45°C. Enquanto para as faixas de pH, quatro (4) estipes sobreviveram em pH 5, e seis (6) em pH 6. Para as BAm, todas as cepas (10) sobreviveram a todas as condições testadas.

Entre as BAc (16), todas sobreviveram a temperatura de 40°C e somente 6 sobreviveram a 45°C. Para as condições de pH, todas sobreviveram as faixas 5 e 6, conforme esperado para esse grupo funcional.

A temperatura é um parâmetro que influencia a atividade metabólica microbiana e, consequentemente, a velocidade de crescimento, reprodução, síntese e degradação de substâncias, enquanto o pH do meio extracelular influencia o desenvolvimento microbiano e desempenho de suas funções por meio da estabilidade da forma das enzimas e das reações químicas que ocorrem no interior da célula (MADIGAN *et al.*, 2016).

De acordo com Tian *et al.* (2018), as estruturas das comunidades bacterianas tendem a diminuir com o aumento de temperatura, o que explica a queda na taxa de sobrevivência testada. Liu *et al.* (2008) relataram que o valor ideal do pH pode variar de acordo com o substrato e a digestão, sendo relativamente ampla. Bactérias hidrolíticas e acidogênicas normalmente operam ativamente em valores de pH ideal entre 5,0 e 6,0 (XU *et al.*, 2018; DEMIRER; CHEN, 2004), o que explica a maior taxa de sobrevivência nessas faixas testadas.

Por influenciarem o metabolismo da comunidade microbiana, temperatura e pH são parâmetros relacionados à eficiência e estabilidade do processo de DA (NIE *et al.*, 2021; FENG *et al.*, 2021). O entendimento da estrutura do microbioma, relacionado a diferentes parâmetros de desempenho, permite o controle e benefício do crescimento de comunidades microbianas centrais e consequente otimização do processo (KHANAL *et al.*, 2021).

Uma vez que o processo biológico de degradação da matéria orgânica ao longo das fases da DA em reatores anaeróbios é muito sensível a mudanças ambientais, o controle de alguns parâmetros torna-se fator importante para evitar desequilíbrios e otimizar o processo (FISGATIVA; TREMIER; DABERT, 2016).

# 4.5 Antagonismo bacteriano e combinações de consórcios

Na Figura 20, observa-se o resultado do teste de antagonismo de algumas cepas bacterianas, em que a identificação da atividade antagônica foi considerada positiva (+), quando detectada a inibição do crescimento com distanciamento ou presença de halos, entre cepas centrais e perpendiculares, e negativa (-), quando não apresentaram a inibição do crescimento, encostando uma na outra ou sobrepostas.

Figura 20 – Resultados do teste de antagonismo bacteriano.

Fonte: Autor (2021).

O antagonismo bacteriano é um fenômeno comum em comunidades microbianas que exibem competição por espaço, pela captação de recursos ou que liberam toxinas que prejudicam outras bactérias, e que resulta no estabelecimento de nichos espaciais e de nutrientes por meio da inibição de crescimento ou morte dos indivíduos vizinhos (YIM; WANG, 2021; KERN *et al.*, 2021).

Os principais filos bacterianos apresentam vias antagônicas a partir de mecanismos independentes ou dependentes de contato (PETERSON *et al.*, 2020). As ações espaciais envolvidas no antagonismo independente de contato podem ocorrer por meio da ação de pequenas moléculas difusíveis entre bactérias fisicamente separadas, enquanto a via dependente de contato pode ocorrer pelo efeito da produção de toxinas e proteínas antibacterianas secretadas que atingem células alvo (KLEIN; AHMAD; WHITNEY, 2020).

No Quadro 04 observa-se o resultado individual do teste de antagonismo para as 20 cepas bacterianas testada.

Quadro 4 – Resultado individual do teste de antagonismo realizado para as cepas selecionadas nos testes anteriores.

Teste de antagonismo bacteriano																				
*	L2	L4	L9	P3	P5	<b>P9</b>	P10	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am10	Ac1	Ac7	Ac14	Ac15	Ac19
L2	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L4		*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	•	+	+	+	-
L9			*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	•	+	+	+	•	-
P3				*	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
P5					*	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P9						*	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
P10							*	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Am1								*	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Am2									*	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Am3										*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Am4											*	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Am5												*	+	+	-	+	+	+	+	+
Am6													*	-	+	-	+	+	+	+
Am7														*	-	+	-	-	-	-
Am10															*	+	+	+	+	+
Ac1																*	+	+	+	+
Ac7																	*	+	+	+
Ac14																		*	+	+
Ac15																			*	+
Ac19																				*

(+): antagonismo positivo; (-): antagonismo negativo.

A compreensão de mecanismos funcionais e papéis ecológicos podem ser exploradas para o desenvolvimento de ferramentas de engenharia e modulação de comunidades microbianas em reatores industriais (YIM; WANG, 2021).

Baseado nesse conhecimento, após a análise dos resultados obtidos, foram construídos consórcios formados por combinações de cepas bacterianas, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 – Consórcios bacterianos formados a partir do teste de antagonismo bacteriano.

Combinaçãos	Grupos bacterianos							
Combinações	Lipolíticas	Proteolíticas	Amilolíticas	Acidogênicas				
	L4+Ac1	P3+Am3	Am1+Am4	*				
	L4+Ac19	P3+Am4	Am1+Am10	*				
	L9+Am10	P3+Am5	Am2+Am7	*				
	L9+Ac15	P3+Am7	Am3+Ac19	*				
	L9+Ac19	P3+Am10	Am4+Am10	*				
	*	P3+Ac14	Am5+Am10	*				
	*	P3+Ac15	Am6+Am7	*				
2 cepas	*	P5+Am7	Am6+Ac1	*				
	*	P9+Am3	Am7+Ac1	*				
	*	P9+Am4	Am7+Ac7	*				
	*	P9+Am7	Am7+Ac14	*				
	*	P9+Am10	Am7+Ac15	*				
	*	P9+Ac1	Am7+Ac19	*				
	*	P10+Am4	*	*				
	*	P10+Ac1	*	*				
	*	P3+Am4+Am10	Am1+Am4+Am10	*				
	*	P3+Am5+Am10	Am2+Am7+Ac19	*				
	*	P3+Am7+Am10	*	*				
3 cepas	*	P3+Am7+Ac14	*	*				
-	*	P3+Am7+Ac15	*	*				
	*	P9+Am4+Am10	*	*				
	*	P9+Am7+Am10	*	*				

Fonte: Autor (2021). (\*): sem formação.

A partir das combinações foi possível a construção de 33 consórcios formados por duas cepas bacterianas e 11 consórcios formados por 3 cepas. A maioria dos ecossistemas sintéticos são compostos por duas a quatro espécies (ROY *et al.*, 2014), o que explica os resultados obtidos.

Entre os consórcios formados, dois consórcios compostos pelas combinações P3+Am7+Ac14 e P3+Am7+Ac15, denominados C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, respectivamente, destacaram-se com maior potencial para otimização de processos em reatores anaeróbios devido à ampla diversidade metabólica das cepas bacterianas em relação aos demais.

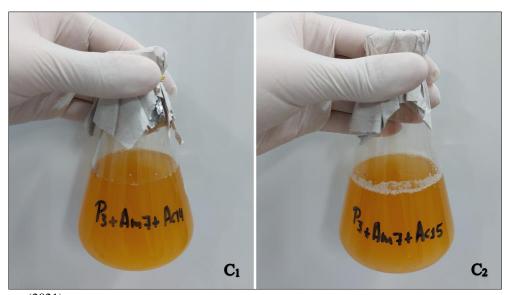
A avaliação combinatória para construção de comunidades sintéticas, compostas por uma mistura de espécies, evita a necessidade de dados mecanísticos detalhados e permite maior controle sobre as espécies utilizadas (ENG; BORENSTEIN, 2019).

Consórcios sintéticos se destacam pela presença de grupos funcionais específicos, apresentando divisão do trabalho, capacidade metabólica expandida, e maior robustez a perturbações (JIANG *et al.*, 2020; MCCARTY; LEDESMA-AMARO, 2019). Por isso, podem ajudar a projetar melhores bioprocessos e a produzir produtos específicos que normalmente são difíceis de produzir usando monoculturas (CAVALIERE *et al.*, 2017).

#### 4.6 Viabilidade da encapsulação bacteriana

Na Figura 21 pode-se observar o crescimento dos consórcios  $C_1$  e  $C_2$ , após o período de incubação em estufa bacteriológica, que foram posteriormente submetidos ao processo de encapsulação para formação do inóculo bacteriano.

Figura 21 – Crescimento dos consórcios  $C_1$  e  $C_2$ , em meio de cultura, após o período de incubação.



**Fonte:** Autor (2021).

C1: consórcio 1; C2: consórcio 2.

Na Figura 22 pode-se observar a concentração do *pellet* do consórcio C<sub>1</sub> ao fundo de tubo *Falcon*, o encapsulamento das macropéloras em solução de cloreto de cálcio 2% e seu armazenamento em frasco universal.

45 40 30 30 22

Figura 22 – Resultados das etapas de encapsulação para o consórcio C<sub>1</sub>.

A: concentração do *pellet*; **B:** encapsulamento das macropérolas; **C:** macropérolas.

 $C_1$ 

A encapsulação do consórcio teve a finalidade de aumentar a probabilidade de sobrevivência das células e melhorar sua eficiência, ao fornecer maior proteção a estresses ambientais, e preservar suas atividades metabólicas por maiores períodos de tempo.

Segundo Zhu *et al.* (2020), Youngsukkasem *et al.* (2012) e Westman *et al.* (2012), a proteção associada ao encapsulamento de células está relacionada proteção contra competidores em potencial e mudanças de condições ambientais adversas como pH, temperatura, solventes orgânicos e componentes tóxicos. Além disso, reduz a complexidade da operação, ao facilitar o manuseio das células microbianas encapsuladas, reduz a baixa produtividade volumétrica e a perda de microrganismos em altas taxas de diluição e melhora o desempenho de reatores.

Na Tabela 6 observa-se o resultado da quantificação das unidades formadoras de colônia viáveis da solução contendo o concentrado bacteriano antes do processo de encapsulação e das macropérolas após o período de 24 horas e sete dias.

Tabela 6 – Quantificação das unidades formadoras de colônias presentes nas macropérolas.

Consórcios	Unidade	População microbiana				
Consorcios	Unidade	24 h	7 dias			
$C_1$	(LIEC/~)	$5,53\times10^{10}$ est.	$2,05\times10^{8}$			
$\mathbf{C}_2$	(UFC/g)	$6,17\times10^{10}$ est.	$4.8 \times 10^{8}$			

**Fonte:** Autor (2021).

C1: consórcio 1; C2: consórcio 2; est.: estimado.

A partir da análise dos resultados, observa-se que para o período de 24 horas a sete dias, a quantificação do consórcio  $C_1$  passou de  $5,53\times10^{10}$  est. para  $2,05\times10^8$  UFC/g. Enquanto o consórcio  $C_2$  apresentou quantificação de  $6,17\times10^{10}$  est para  $4,8\times10^8$  UFC/g.

Apesar da redução na escala exponencial da quantificação das unidades formadoras de colônias, ambos os inóculos apresentaram viabilidade das cepas bacterianas após o processo de encapsulação para o período analisado.

O efeito do encapsulamento sobre as células microbianas pode afetar diretamente a atividade metabólica devido à promoção de mudanças no microambiente (WESTMAN *et al.*, 2012). De acordo com Amine *et al.* (2014), a viabilidade celular geralmente tende a diminuir ao longo do período de armazenamento do material encapsulado, o que explica os resultados obtidos.

Além disso, a eficiência da encapsulação é influenciada por diferentes variáveis como o método utilizado, as características do material encapsulador, o tamanho dos grânulos formados, a concentração de microrganismos, dentre outros (NAZZARO *et al.*, 2012; CHANDRAMOULI *et al.*, 2004). Por isso, ressalta-se que, apesar dos resultados demonstrarem viabilidade dos inóculos, é necessário a aplicação de ambos em reatores anaeróbios para a análise da eficiência individual.

# 5 CONCLUSÃO

As etapas realizadas caracterizam uma estratégia a ser adotada para montagem de inóculos iniciadores para otimizar o processo de digestão anaeróbia em reatores, uma vez que a prospecção dos isolados bacterianos provenientes de sedimento do açude Santo Anastácio permitiu:

- Caracterizar fenotípica e bioquimicamente os isolados bacterianos quanto a morfologia, estrutura da parede celular e metabolismo anaeróbio facultativo;
- Selecionar cepas bacterianas capazes de sobreviver em condições ambientais adversas (temperatura e pH);
- Selecionar cepas com relações antagônicas negativas;
- Formar consórcios com ampla diversidade metabólica;
- Construir dois inóculos formados por culturas bacterianas com potencial para otimização do tratamento de resíduos sólidos orgânicos em reatores anaeróbios;
- Confirmar a sobrevivência das cepas ao processo de encapsulação do inóculo.

Ressalta-se a realização de uma etapa posterior com ampliação dos grupos funcionais microbianos envolvidos no processo de digestão anaeróbia, completando o ciclo de degradação dos substratos e produção de biogás no sistema. Além da aplicação de testes em diferentes escalas com a inoculação de reatores e monitoramento do desempenho do processo.

# REFERÊNCIAS

- ABENDROTH, C.; VILANOV, C.; GÜNTHER, T.; LUSCHNIG, O.; PORCAR, M. Eubacteria and archaea communities in seven mesophile anaerobic digester plants in Germany. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1-10, 2018.
- ABNT. **NBR ISO 37120:2017: Desenvolvimento sustentável de comunidades - Indicadores para serviços urbanos e qualidade de vida**. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro, 2017, 103 p.
- ABNT. NBR ISSO 37122:2020: Cidades e comunidades sustentáveis Indicadores para cidades inteligentes. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro, 2017, 112 p.
- ABU-RAYASH, A.; DINCER, I. Development of integrated sustainability performance indicators for better management of smart cities. **Sustainable Cities and Society**, v. 67, p. 1-13, 2021.
- ADNAN, A. I.; ONG, M. Y.; NOMANBHAY, S.; CHEW, K. W.; SHOW, P. L. Technologies for biogas upgrading to biomethane: a review. **Bioengineering**, v.6, p. 1-24, 2019.
- AHMAD, T.; ZHANG, D. A critical review of comparative global historical energy consumption and future demand: the story told so far. **Energy Reports**, v. 6, p. 1973-1991, 2021.
- AL-WAHAIBI, A.; OSMAN, A. I.; AL-MUHTASEB, A. H.; ALQAIS, M.; BAAWAIN, M.; FAWZY, S.; ROONEY, D. W. Techno-economic evaluation of biogas production from food waste via anaerobic digestion. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-16, 2020.
- AMARAL, A. C. do; STEINMETZ, R. L. R.; KUNZ, A. Os biodigestores. In: KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. (ORGs). **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás e tratamento do digestato**. 1ª Ed. Concórdia: Sbera Embrapa Suínos e Aves, 2019, 209 p.
- AMBAYE, T. G.; VACCARI, M.; BONILLA-PETRICIOLET, A.; PRASAD, S.; HULLEBUSCH, E. D. van; RTIMI, S. Emerging technologies for biofuel production: a critical review on recent progress, challenges and perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 290, p. 1-16, 2021.
- AMIN, F. R.; KHALID, H.; EL-MASHAD, H. M.; CHEN, C.; LIU, G.; ZHANG, R. Functions of bacteria and archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 1-21, 2021.
- ARAÚJO, G. M.; LIMA NETO, I. E.; BECKER, H. Phosphorus dynamics in a highly polluted urban drainage channel-shallow reservoir system in the Brazilian semiarid. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1-8, 2019.

- ARYAL, N.; KVIST, T.; AMMAM, F.; PANT, D.; OTTOSEN, L. D. M. An overview of microbial biogas enrichment. **Bioresource Tecnology**, v. 264, p. 359-369, 2018.
- AWHANGBO, L.; BENDOULA, R.; ROGER, J. M.; BÉLINE, L. Detection of early imbalances in semi-continuous anaerobic codigestion process based on instantaneous biogas production rate. **Water Research**, v. 171, p. 1-12, 2020.
- AZMAN, S.; KHADEM, A. F.; LIER, J. B. van; ZEEMAN, G.; PLUGGE, C. M. Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogás production. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 2523-2564, 2015.
- BABU, R.; VERAMENDI, P. M. P.; RENE, E. R. Strategies for resource recovery from the organic fraction of municipal solid waste. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 3, p. 1-8, 2021.
- BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIĆ, M. K.; BAJPAI, R.; STAHL, U. Relevance of microbial coculture fermentations in Biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 371-387, 2009.
- BELOSTOTSKIY, D. E.; ZIGANSHINA, E. E.; SINIAGINA, M.; BOULYGINA, E. A.; MILUYKOV, V. A.; ZIGANSHIN, A. M. Impact of the substrate loading regime and phosphoric acid supplementation on performance of biogas reactors and microbial community dynamics during anaerobic digestion of chicken wastes. **Bioresouce Technology**, v. 193, p. 42-52, 2015.
- BENCKE, L. R.; PEREZ, A. L. F. Análise dos principais modelos de indicadores para cidades sustentáveis e inteligentes. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, v. 37, p. 68-85, 2018.
- BERAUD-MARTÍNEZ, L. K.; GÓMEZ-GIL, B.; FRANCO-NAVA, M. A.; ALMAZÁN-RUEDA, P.; BETANCOURT-LOZANO, M. A metagenomic assessment of microbial communities in anaerobic bioreactors and sediments: taxonomic and functional relationships. **Anaerobe**, v. 68, p. 1-9, 2021.
- BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T.; VERGÈS, M-C. C.; CHARLES, T.; CHEN, X.; COCOLIN, L.; EVERSOLE, K.; CORRAL, G. H.; KAZOU, M.; KINDEL, L.; LANGE, L.; LIMA, N.; LOY, A.; MACKLIN, J. A.; MAGUIN, E.; MAUCHLINE, T.; MCCLURE, R.; MITTER, B.; RYAN, M.; SARAND, I.; SMIDT, H.; SCHELKLE, B.; ROUME, H.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; SOUZA, R. S. C. de; OVERBEEK, L. van; SINGH, B. K.; WAGNER, M.; WALSH, A.; SESSITSCH, A.; SCHLOTER, M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, p. 1-22, 2020.
- BIANCHINI JUNIOR, I.; CUNHA-SANTINO, B. M.; RIBEIRO, J. U.; PENTEADO, D. G. B. Implication of anaerobic and aerobic decomposition of Eichhornia azurea (Sw.) Kunth. on the carbon cycling in a subtropical reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p. 100-110, 2014.

- BIBRI, S. E.; KROGSTIE, J. Smart sustainable cities of the future: An extensive interdisciplinar literature review. **Sustainable Cities and Society**, v. 31, p. 183-212, 2017.
- BRASIL. Lei Nº 12.305 de 2 de agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. DOU. 2010; 3 ago.
- BRASIL. Lei N° 13.576 de 26 de dezembro de 2017. **Política Nacional de Biocombustíveis**. DOU. 2017; 27 dez.
- BRÉMOND, A.; BUYER, R. de; STEYER, J-P.; BERNET, N.; CARRERE, H. Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 583-604, 2021.
- CABEZAS, A.; ARAUJO, J. C. de; CALLEJAS, C.; GALÈS, A.; HAMELIN, J.; MARONE, A.; SOUSA, D. Z.; TRABLY, E.; ETCHEBEHERE, C. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 555-593, 2015.
- CALUSINSKA, M.; GOUX, X.; FOSSÉPRÉ, M.; MULLER, E. E. L.; WILMES, P.; DELFOSSE, P. A year of monitoring 20 mesophilic full-scale bioreactors reveals the existence of stable but different core microbiomes in bio-waste and wastewater anaerobic digestion systems. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 1-19, 2018.
- CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27-35, 2004.
- CAMPANARO, S.; TREU, L.; ROFRIGUEZ-R, L. M.; KOVALOVSZKI, A.; ZIELS, R. M.; MAUS, I.; ZHU, X.; KOUGIAS, P. G.; BASILE, A.; LUO, G.; SCHLÜTER, A.; KONSTANTINIDIS, K. T.; ANGELIDAKI, I.; New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, p. 1-18, 2020.
- CARBALLA, M.; REGUEIRO, L.; LEMA, J. M. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 103-111, 2015.
- CARUSO, M. C.; BRAGHIERI, A.; CAPECE, A.; NAPOLITANO, F.; ROMANO, P.; GALGANO, F.; ALTIERI, G.; GENOVESE, F. Recent updates on the use of agro-food waste for biogas production. **Applied Sciences**, v. 9,1-19, 2019.
- CAVALIERE, M.; FENG, S.; SOYER, O. S.; JIMENEZ, J. I. Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. **Environmental Microbiology**, v. 19, p. 2949-2963, 2017.
- CAYETANO, R. D. A.; PARK, J.; KIM, G-B.; JUNG, J-H.; KIM, S-H. Enhanced anaerobic digestion of waste-activated sludge via bioaugmentation strategy—Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states (PICRUSt2) analysis through hydrolytic enzymes and possible linkage to system performance. **Bioresource Technology**, v.332, p. 1-9, 2021.

- CHRISTY, P. M.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.34, p. 167-173, 2014.
- CIBIOGÁS ENERGIAS RENOVÁVEIS. Nota técnica: N° 001/2021 Panorama do Biogás no Brasil em 2019. Foz do Iguaçu, abr. 2021.
- CLINTON, S.; JOHNSON, J.; LAMBIRTH, K.; SUN, S.; BROUWER, C.; KEEN, O.; REDMOND, R.; FODOR, A.; GIBAS, C. Sediment microbial diversity in urban Piedmont North Carolina watersheds receiving wastewater input. **Water**, v. 12, p. 1-16, 2020.
- COELHO, N. M. G.; DROSTE, R. L.; KENNEDY, K. J. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. **Water Research**, v. 45, p. 2822-2834, 2011.
- COWAN, M. K.; SMITH, H. Tools of laboratory: methods for the culturing and microscopic analysis of microorganisms. In: COWAN, M. K.; SMITH, H. (Eds). **Microbiology:** a system approach. 5th Ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018, 864p.
- CURY, M. J. F.; MARQUES, J. A. L. F. A cidade inteligente: uma reterritorialização. **Redes** (**Santa Cruz do Sul**), v. 22, p. 102-117, 2017.
- DATE, Y.; LIKURA, T.; YAMAZAWA, A.; MORIYA, S.; KIKUCHI, J. Metabolic sequences of anaerobic fermentation on glucose-based feeding substrates based on correlation analyses of microbial and metabolite profiling. **The Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 5602-5610,2012.
- DEEMER, B. R.; HARRISON, J. A.; LI, S.; BEAULIEU, J. J.; DELSONTRO, T.; BARROS, N.; BEZERRA-NETO, J. F.; POWERS, S. M.; SANTOS, M. A. DOS; VONK, J. A. Greenhouse Gas Emissions from Reservoir Water Surfaces: A New Global Synthesis. **BioScience**, v. 66, p. 949-964, 2016.
- DEMIRER, G. N.; CHEN, S. Effect of retention time and organic loading rate on anaerobic acidification and biogasification of dairy manure. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 1381-1387, 2004.
- DESSIE, W.; LUO, X.; WANG, M.; FENG, L.; LIAO, Y.; WANG, Z.; YONG, Z.; QIN, Z. Current advances on waste biomass transformation into value-added products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 4757-4770, 2020.
- DRAKE, H. L.; GÖßNER, A. S.; DANIEL, S. L. Old acetogens, new light. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 100-128, 2008.
- DU, Y.; ZOU, W.; ZHANG, K.; YE, G.; YANG, J. Advances and application of Clostridium co-culture systems in biotechnology. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p, 1-22, 2020.
- EGAN, A. J. F.; ERRINGTON, J.; VOLLMER, W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 446-460, 2020.

- EL-MASHAD, H. M.; ZEEMAN, G.; LOON, W. K. P. van; BOT, G. G. P. A.; LETTINGA, G.; Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 191-201, 2004.
- EPE EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (BRASIL). **Balanço energético nacional 2021:** ano base 2020. Rio de janeiro: EPE, 2021, 292p.
- ENG, A.; BORENSTEIN, E. Microbial community design: methods, applications, and opportunities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 58, p. 117-120, 2019.
- MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2th Ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1980. 527p.
- FISGATIVA, H.; TREMIER, A.; DABERT, P. Characterizing the variability of food waste quality: A need for efficiente valorisation through anaerobic digestion. **Waste Management**, v. 50, p. 264-274, 2016.
- FOLCH, P. L.; BISSCHOPS, M. M. M.; WEUSTHUIS, R. A. Metabolic energy conservation for fermentative product formation. **Microbial Biotechnology**, v. 14, 829-858, 2021.
- FRAGA, R. F.; ROCHA, S. M. G.; LIMA NETO, I. E. Impact of flow conditions on coliform dynamics in an urban lake in the Brazilian semiarid. **Urban Water Journal**, v. 17, p.43-53, 2020.
- FREITAS, F. F.; SOUZA, S. S. de.; FERREIRA, L. R. A.; OTTO, R. B.; ALESSIO, F. J.; SOUZA, S. N. de; VENTURINI, O. J.; ANDO JUNIOR, O. H. The Brazilian market of distributed biogas generation: overview, technological development and case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 101, p. 146-157, 2019.
- GAO, M.; SONG, J.; WANG, Y.; ZHANG, S.; SHENG, C.; SHANG, Z.; YANG, G.; WANG, X.; FENG, Y. Dynamic interaction mechanism of environment, microorganisms, and functions in anaerobic digestion of food waste with magnetic powder supplement. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 1-8, 2021.
- GARRÉ, C. Ueber Antagonisten unter den Bakterien. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd**, v. 2, p. 312-313, 1887.
- GAZALI, T. A.; MOQSUD, M. A. The Effectiveness of Animal Dungs and Leaf Mold for Bioelectricity Generation Using Microbial Fuel Cell with Soils. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 7, p. 165-181, 2017.
- GIMENES, K. Z.; CUNHA-SANTINO, M. B. da; BIANCHINI JÚNIOR, I. Decomposição de matéria orgânica alóctone e autóctone em ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 1036-1073, 2010.
- GLIVIN, G.; KALAISELVAN, N.; MARIAPPAN, V.; PREMALATHA, M.; MURUGAN, P. C.; SEKHAR, J. Conversion of biowaste to biogas: A review of current status on technoeconomic challenges, policies, technologies and mitigation to environmental impacts. **Fuel**, v. 302, p. 1-16, 2021.

- GOPINATH, L. R.; CHRISTY, P. M.; MAHESH, K.; BHUVANESWARI, R.; DIVYA, D. Identification and evaluation of effective bacterial consortia for efficient biogas production. **IOSR Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology**, v. 8, p. 80-86, 2014.
- GUO, H.; WU, S.; TIAN, Y.; ZHANG, J.; LIU, H. Application of machine learning methods for the prediction of organic solid waste treatment and recycling processes: A review. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 1-13, 2021.
- HAYHURST, E. J.; KAILAS, L.; HOBBS, J. K.; FOSTER, S. J. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 14603-14608, 2008.
- HUGH, R.; LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 66, p. 24-26, 1953.
- IGLESIAS, R.; MUÑOZ, R.; POLANCO, M.; DÍAZ, I.; SUSMOZAS, A.; MORENO, A. D.; GUIRADO, M.; CARRERAS, N.; BALLESTEROS, M. Biogas from anaerobic digestion as an energy vector: current upgrading development. **Energies**, v. 14, p. 1-30, 2021.
- IPECE. **Perfil Básico Municipal 2021:** Fortaleza. Disponível em: http://ipecedata.ipece.ce.gov.br/ipece-data-web/module/perfil-municipal.xhtml. Acesso em: 06 mar. 2021.
- IQBAL, M. W.; KANG, Y. Waste-to-energy supply chain management with energy feasibility condition. **Journal of Cleaner Production**, v. 291, p. 1-15, 2021.
- ISTRATE, I. R.; MEDINA-MATOS, E.; GALVEZ-MATOS, J. L.; DUFOUR, J. Assessment of the energy recovery potential of municipal solid waste under future scenarios. **Applied Energy**, v. 293, p. 1-12, 2021.
- IZUMI, K.; OKISHIO, Y. K.; NAGAO, N.; NIWA, C.; YAMAMOTO, S.; TODA, T. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 601-608, 2010.
- JAIN, S.; JAIN, S.; WOLF, I. T.; LEE, J.; TONG, Y. W. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 142-154, 2015.
- JIANG, Y.; DONG, W.; XIN, F.; JIANF, M. Designing synthetic microbial consortia for biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 38, p. 828-831, 2020.
- JIMENEZ, J.; GRIGATTI, M.; BOANINI, E.; PATUREAU, D.; BERNET, N. The impact of biogas digestate typology on nutrient recovery for plant growth: Accessibility indicators for first fertilization prediction. **Waste Management**, v. 117, p. 18-31, 2020.

- JOHNS, N. I.; BLAZEJEWSKI, T.; GOMES, A. LC.; WANG, H. H. Principles for designing synthetic microbial communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 146-153, 2016.
- KÄHKÖNEN, M. A.; HAKULINEN, R. Stratification of selected hydrolytic enzyme activities in the sediment in two lakes in Finland. **International Journal of Sediment Research**, v. 27, p. 250-258, 2012.
- KAYA, K.; AK, E.; YASLAM, Y.; OKTUG, S. F. Waste-to-Energy Framework: An intelligent energy recycling management. **Sustainable Computing: Informatics and Systems**, v. 30, p. 1-14, 2021.
- KERN, L.; ABDEEN, S. K.; KOLODZIEJCZYK, A. A.; ELINAV, E. Commensal interbacterial interactions shaping the microbiota. **Current Opinion in Microbiology**, v. 63, p. 158-171, 2021.
- KHALID, A.; ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. **Waste Management**, v. 31, p. 1737-1744, 2011.
- KHANAL, S. K.; LÜ, F.; WONG, J. W. WU, D.; OECHSNER, H. Anaerobic digestion beyond biogás. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 1-7, 2021.
- KIRCHMAN, D. L.; YU, L.; COTTRELL, M. T. Diversity and Abundance of Uncultured *Cytophaga*-Like Bacteria in the Delaware Estuary. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6587-6596, 2003.
- KLEIN, T. A.; AHMAD, S.; WHITNEY, J. C. Contact-dependent interbacterial antagonism mediated by protein secretion machines. **Trends in Microbiology**, v. 28, p. 387-400, 2020.
- KOCH, C.; MÜLLER, S.; HARMS, H.; HARNISCH, F. Microbiomes in bioenergy production: from analysis to management. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 65-72, 2014.
- KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production a review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1821-1830, 2014.
- KONIECZNA, I.; WOJTASIK, B.; KWINKOWSKI, M.; BURSKA, D.; NOWIŃSKI, K.; ŻARNOWIEC, P.; KACA, W. Analysis of cultivable aerobic bacteria isolated from bottom sediments in the Wijdefjorden region, Spitsbergen. **Polish Polar Reasearch**, v. 31, p. 181-195, 2011.
- KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO JUNIOR., R. The Use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 103-115, 1998.
- KOUGIAS, P. G.; ANGELIDAKI, I. Biogas and its opportunities a review. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 12, p. 1-12, 2018.

- KOVÁCS, K. L.; ÁCS, N.; KOVÁCS, E.; WIRTH, R.; RÁKHELY, G.; STRANG, O.; HERBEL, Z.; BAGI, Z. Improvement of biogas production by bioaugmentation. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- KOVALOVSZKI, A.; TREU, L.; ELLEGAARD, L.; LUO, G.; ANGELIDAKI, I. Modeling temperature response in bioenergy production: Novel solution to a common challenge of anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 263, p. 1-11, 2020.
- LAWSON, C. E.; HARCOMBE, W. R.; HATZENPICHLER, R.; LINDEMANN, S. R.; LÖFFLER, F. E.; O'MALLEY, M. A.; MARTÍN, H. G.; PFLEGER, B. F.; RASKIN, L.; VENTURELLI, O. S.; WEISSBRODT, D. G.; NOGUERA, D. R.; MCMAHON, K. D. Common principles and best practices for engineering microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 725-741, 2019.
- LEWIS, W. H.; TAHON, G.; GEESINK, P.; SOUSA, D. Z.; ETTEMA, T. J. G. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 225-240, 2021.
- LIAQUAT, R.; JAMAL, S.; TAUSEEF, I.; QURESHI, Z.; FAROOQ, U.; IMRAN, M.; ALI, M. I. Characterizing bacterial consortia from an anaerobic digester treating organic waste for biogas production. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, p. 709-716, 2017.
- LI, L.; HE, Q.; MA, Y.; WANG, X.; PENG, X. A mesophilic anaerobic digester for treating food waste: process stability and microbial community analysis using pyrosequencing. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p. 1-11, 2016.
- LIU, C. F.; YUAN, Z. X.; ZENG, G. M.; LI, W. W.; LI, J. Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 882–888, 2008.
- LIU, G.; HAO, Y.; DONG, L.; YANG, Z.; ZHANG, Y.; ULGIATI, S. An emergy-LCA analysis of municipal solid waste management. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 120, p. 131-143, 2017.
- LIU, G.; ZHANG, R.; EL-MASHAD, H. M.; DONG, R. Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5103-5108, 2009.
- LIUXY, P. C.; LEE, K. K.; CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 413-416, 1996.
- LV, Y.; CHANG, N.; LI, Y-Y.; LIU, J. Anaerobic co-digestion of food waste with municipal solid waste leachate: A review and prospective application with more benefits. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 174, p. 1-10, 2021.
- LI, Y.; CHEN, Y.; WU, J. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. **Applied Energy**, v. 240, p. 120-137, 2019.

- LYTRAS, J.; LYTRAS, C.; MATHIOUDAKIS, D.; PAPADOPOULOU, K.; LYBERATOS, G. Food waste valorization based on anaerobic digestion. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 1677-1697, 2021.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14th Ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016, 1032 p.
- MA, G.; CHEN, Y.; NDEGWA, P. Association between methane yield and microbiota abudance in anaerobic digestion process: a meta-regression. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 135, p. 1-12, 2021.
- MANYI-LOH, C. E.; MAMPHWELI, S. N.; MEYER, E. L.; OKOH, A. I.; MAKAKA, G.; SIMON, M. Microbial Anaerobic digestion (bio-digesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy. **International Journal of Evironmental and Public Health**, v. 10, p. 4390-4417, 2013.
- MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540-555, 2015.
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, p. 1-3, 2015.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2ª Ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005, 158 p.
- MATHERI, A. N.; MBOHWA, C.; NTULI, F.; BELAID, M.; SEODIGENG, T.; NGILA, J. C.; NJENGA, C. K. Waste to energy bio-digester selection and design model for the organic fraction of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 1113-1121, 2018.
- MAYER, C.; KLUJ, R. M.; MÜHLECK, M.; WALTER, A.; UNSLEBER, S.; HOTTMANN, I.; BORISOVA, M. Bacteria's different ways to recycle their own cell wall. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, p. 1-10, 2019.
- MCCARTY, N. S.; LEDESMA-AMARO, R. Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 37, p. 181-197, 2019.
- MEEDOGA, J. N.; LI, B.; PATEL, K.; WANG, L. B. A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, p. 1-16, 2018.
- MÉLO-SCHLUB, a. c.; SILVA, L. A. de O. da; HOLANDA, S. H. de B.; FIRMO, A. L. B.; JUCÁ, J. F. T. Resíduos sólidos urbanos: potencial fonte de carbono para degradação microbiana e produção de biogás. **Brazilian Journal of Development**, v. 5., p. 11927-11942, 2019.

- MILANEZ, A. Y.; GUIMARÃES, D. D.; MAIA, G. B. da S.; SOUZA, J. A. P. de; LEMOS, M. L. F. Biogás de resíduos agroindustriais: panorama e perspectivas. **BNDES Setorial**, v. 47, p. 221-276, 2018.
- MILTINER, M.; MAKARUK, A.; HARASEK, M. Review on available biogas upgrading technologies and innovations towards advanced solutions. **Journal of Cleaner Production**, v. 161, p. 1329-1337, 2017.
- MIRMOHAMADSADEGHI, S.; KARIMI, K.; TABATABAEI, M.; AGHBASHLO, M. Biogas production from food wastes: a review on recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 1-10, 2019.
- MISHRA, A.; KUMAR, M.; BOLAN, N. S.; KAPLEY, A.; KUMAR, R.; SINGH, L. Multidimensional approaches of biogas production and up-gradation: opportunities and challenges. **Bioresouce Technology**, v. 338, p. 1-13, 2021.
- MIURA, T.; KIRA, A.; OKAMURA, Y.; AKI, T.; MATSUMURA, Y.; TAJIMA, L.; KATO, J.; NAKASHIMADA, Y. Improved methane production from brown algae under high salinity by fed-batch acclimation. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 275-281, 2015.
- MOULD, D. L; HOGAN, D. H. Intraspecies heterogeneity in microbial interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 62, p. 14-20, 2021.
- MÜLLER, L. N. P. e S.; ARRUDA, J. B. F.; ALCANTARA, R. L. C.; PEREIRA, R. L. Uma análise multicritério de alternativas para o tratamento de resíduos sólidos urbanos do município de Juazeiro do Norte no Ceará. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 26, p. 159-170, 2021.
- NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 182-186, 2012.
- NEVZOROVA, T.; KUTCHEROV, V. Barriers to the wider implementation of biogas as a source of energy: a state-of-the-art review. **Energy Strategy Reviews**, v. 26, p. 1-12, 2019.
- NIE, E.; HE, P; ZHANG, H.; HAO, L.; SHAO, L.; LÜ, F. How does temperature regulate anaerobic digestion? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 150, p. 1-11, 2021.
- OZBAYRAM, E. G.; KLEINSTEUBER, S.; NIKOLAUSZ, M.; INCE, B.; INCE, O. Bioaugmentation of anaerobic digesters treating lignocellulosic feedstock by enriched microbial consortia. **Engeneering in Life Sciences**, v. 18, p. 440-446, 2018.
- OZBAYRAM, E. G.; KLEINSTEUBER, E. S.; NIKOLAUSZ, M.; INCE, B.; INCE, O. Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw. **Anaerobe**, v.46, p. 122-130, 2017.
- PAGALING, E.; STRATHDEE, F.; SPEARS, B. M.; CATES, M. E.; ALLEN, R. J.; FREE, A. Community history affects the predictability of microbial ecosystem development. **International Society for Microbial Ecology**, v. 8, p. 19-30, 2014.

- PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYTESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, v. 146, p. 161-172, 2016.
- PATEL, D.; BAPODRA, S. L.; MADAMWAR, D.; DESAI, C. Electroactive bacterial community augmentation enhances the performance of a pilot scale constructed wetland microbial fuel cell for treatment of textile dye wastewater. **Bioresouce Technology**, v. 332, p. 1-12, 2021.
- PATIL, S. M.; KURADE, M. B.; BASAK, B.; SAHA, S.; JANG, M.; KIM, S-H.; JEON, B-H. Anaerobic co-digester microbiome during food waste valorization reveals Methanosaeta mediated methanogenesis with improved carbohydrate and lipid metabolism. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 1-10, 2021.
- PECES, M.; ASTALS, S.; JENSEN, P. D.; CLARKE, W. P. Deterministic mechanisms define the long-term anaerobic digestion microbiome and its functionality regardless of the initial microbial community. **Water Research**, v. 141, p. 366-376, 2018.
- PELLERA, F-M.; GIDARAKOS, E. Effect of substrate to inoculum ratio and inoculum type on the biochemical methane potential of solid agroindustrial waste. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p. 3217-3229, 2016.
- PETERSON, S. B.; BERTOLLI, S. K.; MOUGOUS, J. D. The Central Role of Interbacterial Antagonism in Bacterial Life. **Current Biology**, v. 30, p. R1203-R1214, 2020.
- PINTO, T.; FLORES-ALSINA, X.; GERNAEY, K. V.; JUNICKE, H. Alone or together? A review on pure and mixed microbial cultures for butanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 147, p. 1-13, 2021.
- PRABHU, V. A.; SIVARAM, A. R.; PRABHU, N.; SUNDARAMAHALINGAM, A. A study of enhancing the biogas production in anaerobic digestion. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 7994-7999, 2021.
- RABII, A.; ALDIN, S.; DAHMAN, Y.; ELBESHBISHY, E. A Review on anaerobic codigestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration. **Energies**, v. 12, p. 1-25, 2019.
- RAPOSO, F.; RUBIA, M. A. D. la; FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V.; BORJA, R. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 861-877, 2012.
- RASAPOOR, M.; YOUNG, B.; BRAR, R.; SARMAH, A.; ZHUANG, W-Q.; BAROUTIAN, S. Recognizing the challenges of anaerobic digestion: Critical steps toward improving biogas generation. **Fuel**, v. 265, p. 1-12, 2020.
- RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN Journal of Food Engineering, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369-381, 2013.

- RAWOOF, S. A. A.; KUMAR, P. S.; VO, DV. N.; SUBRAMANIAN, S. Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 1 043-1063, 2021.
- REGUERA, G.; NEVIN, K. P.; NICOLL, J. S.; COVALLA, S. F.; WOODARD, T. L.; LOVLEY, D. R. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7345-7348, 2006.
- REN, Y.; YU, M.; WU, C.; WANG, Q.; GAO, M.; HUANG, Q.; YU, L. A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1069-1076, 2018.
- ROELL, G. W.; ZHA, J.; CARR, R. R.; KOFFAS, M. A.; FONG, S. S.; TANG, Y. J. Engineering microbial consortia by division of labor. **Microbial Cell Factories**, v. 18, p. 1-11, 2019.
- ROOPNARAIN, A.; RAMA, H.; NDABA, B.; BELLO-AKINOSHO, M.; BAMUZA-PEMU, E.; ADELEKE, R. Unravelling the anaerobic digestion 'black box': Biotechnological approaches for process optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 152, p. 1-21, 2021.
- ROY, K. De; MARZORATI, M.; ABBEELE, P. V. den; WIELE, T. V. de; BOON, N. Synthetic microbial ecossystem: na exciting tool to understand and apply microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 1472-1481, 2014.
- SAHA, S.; BASAK, B.; HWANG, J-H.; SALAM, E-S.; CHARTTERJEE, P. K.; JEON, B-H. Microbial symbiosis: a network towards biomethanation. **Trends in Microbiology**, v. 28, p. 968-964, 2020.
- SAMANI, M. R. G.; HOSSEINI-MOTLAGH, S. M. A mixed uncertainty approach to design a bioenergy network considering sustainability and efficiency measures. **Computers and Chemical Engineering**, v. 149, p. 1-20, 2021.
- SAWATDEENARUNAT, C.; SURENDRA, K. C.; TAKRA, D.; OECHSNER, H.; KHANAL, S. K. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 178-186, 2015.
- SHAH, A. V.; SRIVASTAVA, V. K.; MOHANTY, S. S.; VARJANI, S. Municipal solid waste as a sustainable resource for energy production: state-of-the-art review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, p. 1-9, 2021.
- SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10-12, 2018.
- SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 557-561, 1993.
- SHIMA, S.; HUANG, G.; WAGNER, T.; ERMLER, U. Structural basis of hydrogenotrophic methanogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, p. 713-733, 2021.

- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 964 p.
- SIDDIQUE, M. N. I.; WAHID, Z. A. Achievements and perspectives of anaerobic codigestion: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 194, p. 359-371, 2018.
- SIGEE, D. C. Bacteria: the main heterotrophic microorganisms in freshwater systems. In: SIGEE, D. C. **Freshwater Microbiology:** biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. Chichester: John Wiley & Sons, 2005, p.287-338.
- SILVA, V. P. M. e; CAPANEMA, L. X. de L. Políticas públicas na gestão de resíduos sólidos: experiências comparadas e desafios para o brasil. **BNDES Setorial**, v. 25, p. 153-200, 2019.
- SIZEMORE, R. K.; STEVENSON, L. H. Method for the isolation of proteolytic marine bactéria. **Applied Microbiology**, v. 20, p. 991-992, 1970.
- ŚLESAK, I.; KULA, M.; ŚLESAK, H.; MISZALSKI, Z.; STRZAŁKA, K. How to define obligatory anaerobiosis? An evolutionary view on the antioxidant response system and the early stages of the evolution of life on Earth. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 140, p. 61-73, 2019.
- TAO, Y.; ERSAHIN, M. E.; GHASIMI, D. S. M.; OZGUN, H.; WANG, H.; ZHANG, X.; GUO, M.; YANG, Y.; STUCKEY, D. C.; LIER, J. B. van; Biogas productivity of anaerobic digestion process is governed by a core bacterial microbiota. **Chemical Engineering Journal**, v.380, p. 1-10, 2020.
- TEESELING, M. C. F. van; PEDRO, M. A. de; CAVA, F. Determinants of Bacterial Morphology: From Fundamentals to Possibilities for Antimicrobial Targeting. **Frontiers in Microbioloy**, v. 8, p. 1-18, 2017.
- TSAPEKOS, P.; KOUGIAS, P. G.; TREU, L.; CAMPANARO, S.; ANGELIDAKI, I. Process performance and comparative metagenomic analysis during co-digestion of manure and lignocellulosic biomass for biogas production. **Applied Energy**, v. 185, p. 12-135, 2017a.
- TSAPEKOS, P.; KOUGIAS, P. G.; VASILEIOU, S. A.; TREU, L.; CAMPANARO, S.; LYBERATOS, G.; ANGELIDAKI, I. Bioaugmentation with hydrolytic microbes to improve the anaerobic biodegradability of lignocellulosic agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 350-359, 2017b.
- THAUER, R. K.; Functionalization of methane in anaerobic microorganisms. **Angewandte Chemie International Eddition**, v. 49, p. 6712-6713, 2010.
- THORNBUSH, M.; GOLUBCHIKOV, O. Smart energy cities: The evolution of the city-energy-sustainability nexus. **Environmental Development**, v. 39, p. 1-7, 2021.
- TIAN, G.; YANG, B.; DONG, M.; ZHU, R.; YIN, F.; ZHAO, X.; WANG, Y.; XIAO, W.; WANG, Q.; ZHANG, W.; CUI, X. The effect of temperature on the microbial communities of peak biogas production in batch biogas reactors. **Renewable Energy**, v. 123, p. 15-25, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 964p.

TYAGI, V. K.; BATHIA, A.; KUBOTA, K.; RAJPAL, A.; AHMED, B.; KHAN, A. A.; KAZMI, A. A.; KUMAR, M. Microbial community dynamics in anaerobic digesters treating organic fraction of municipal solid waste. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 1-19, 2021.

UN. UNITED NATIONS. **Transforming our world:** the 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015. Disponível em: <

https://www.un.org/ga/search/view\_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E>. Acesso em 18 ago 2021.

UN. UNITED NATIONS. **World urbanization prospects:** the 2018 revision. 2018. Disponível em: <

https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/files/documents/2020/Jan/un\_2018\_wup\_report.pdf>. Acesso em 19 ago 2021.

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, v. 89, p. 913-933, 2010.

VARTOUKIAN, S. R. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria. **Journal of Oral Biosciences**, v. 58, p. 143-149, 2016.

VEEKEN, A.; HAMELERS, B. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste componentes. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 249-254, 1999.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. 2 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019, 256p.

VRIEZE, J. D. GILDEMYN, S.; VILCHEZ-VARGAS, R.; JÁUREGUI, R.; PIEPER, D. H.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Inoculum selection is crucial to ensure operational stability in anaerobic digestion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p.189-199, 2015.

VRIEZE, J. D. The next frontier of the anaerobic digestion microbiome: From ecology to process control. **Environmental Science and Ecotechnology**, v.3, p. 1-5, 2020.

WAINAINA, S.; AWASTHI, M. K.; SARSAIYA, S.; CHEN, H.; SINGH, E.; KUMAR, A.; RAVINDRAN, B.; AWASTHI, S. K.; LIU, T.; DUAN, Y.; KUMAR, S.; ZHANG, Z.; TAHERZADEH, M. J. Resource recovery and circular economy from organic solid waste using aerobic and anaerobic digestion Technologies. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 1-14, 2020.

WANG, P.; WANG, H.; QIU, Y.; REN, L.; JIANG, B. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production - a review. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 29-36, 2018.

- WESTERHOLM, M; LIU, T.; SCHNÜRER, A. Comparative study of industrial-scale high-solid biogas production from food waste: Process operation and microbiology. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 1-10, 2020.
- WEI, Y.; WU, Y.; ZHANG, L.; ZHOU, Z.; ZHOU, H.; YAN, X. Genome recovery and metatranscriptomic confirmation of functional acetate-oxidizing bacteria from enriched anaerobic biogas digesters. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 1-10, 2020.
- WESTMAN, J. O.; YLITERVO, P.; FRANZÉN, C. J.; TAHERZADEH, M. J. Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1441-1454, 2012.
- WOJCIESZAK, M.; PYZIK, A.; POSZYTEK, A.; KRAWCZYK, P. S.; SOBCZAK, A.; LIPINSKI, L.; ROUBINEK, O.; PALIGE, J.; SKLODOWSKA, A.; DREWNIAK, L. Adaptation of methanogenic inocula to anaerobic digestion of maize silage. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-12, 2017.
- WU, D.; PENG, X.; LI, L.; YANG, P.; PENG, Y.; LIU, H.; WANG, X. Commercial biogas plants: Review on operational parameters and guide for performance optimization. **Fuel**, v. 303, p. 1-14, 2021.
- XIE, J.; TANG, H.; HUANG, T.; YU, F. R.; XIE, R.; LIU, J.; LIU, Y.; **IEEE** Communications Surveys & Tutorials, v. 21, p. 2794-2830, 2019.
- XU, R.; FANG, S.; HUANG, W.; SHAO, Q.; FANG, F.; FENG, Q.; CAO, J.; LUO, J. Distribution patterns of functional microbial community in anaerobic digesters under different operational circumstances: a review. **Bioresource Technology**, v. 341, p. 1-14, 2021.
- XU, R.; ZHANG, K.; LIU, P.; KHAN, A.; XIONG, J.; TIAN, F.; LI, X. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1119-1127, 2018.
- YADAV, A. N.; YADAV, N.; KOUR, D.; KUMAR, A.; YADAV, K.; KUMAR, A.; RASTEGARI, A. A.; SACHAN, S. G.; SINGH, B.; CHAUHAN, V. S.; SAXENA, A. K. Bacterial community composition in lakes. In: BANDH, S. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N. **Freshwater Microbiology:** perspectives of bacterial dynamics in lakes. 1th Ed. Srinagar: Academic Press, 2019, p. 1-71.
- YANG, J.; JIANG, H.; DONG, H.; WANG, H.; WU, G.; HOU, W.; LIU, W.; ZHANG, C.; SUN, Y.; LAI, Z. amoA-encoding archaea and thaumarchaeol in the lakes on the northeastern Qinghai-Tibetan Plateau, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-17, 2013.
- YIM, S. S.; WANG, H. H. Exploiting interbacterial antagonism for microbiome engineering. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 19, p. 1-19, 2021.
- YI, Y.; LIN, C.; WANG, W.; SONG, J. Habitat and seasonal variations in bacterial community structure and diversity in sediments of a Shallow lake. **Ecological Indicators**, v. 120, p. 1-13, 2021.

- YOUNGSUKKASEM, S.; BARGHI, H.; RAKSHIT, S. K.; TAHERZADEH, M. J. Rapid biogás production by compact multi-layer membrane bioreactor: efficiency of synthetic polymeric membranes. **Energies**, v. 6, p. 6211-6224, 2013.
- YOUNGSUKKASEM, S.; RAKSHIT, S. K.; TAHERZADEH, S. J. Biogas production by encapsulated methane producing bacteria. **BioResources**, v. 7, p. 56-65, 2012.
- YOUSELFI, A.; HEJAZI, P.; ALLAHVERDI, A. Evaluation of effective strategies for cultivation of *Acidithiobacillus thiooxidans* as cement-degrading bacteria. **Iranian Journal of Chemical Engineering**, v. 10, p. 55-66, 2013.
- ZAMRI, M. F. M. A.; HASMADY, S.; AKHIAR, A.; IDERIS, F.; SHAMSUDDIN, A. H.; MOFIJUR, M.; FATTAH, I. M. R.; MAHLIA, T. M. I. A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 137, p. 1-17, 2021.
- ZHANG, C.; SU, H.; BAEYENS, J.; TAN, T. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 383-392, 2014.
- ZHANG, L; LOH, K-C.; LIM, J. W.; ZHANG, J. Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 100, p. 110-126, 2019.
- ZHANG, L.; LOH, K-C.; ZHANG, J. Enhanced biogas production from anaerobic digestion of solid organic wastes: Current status and prospects. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 280-296, 2019.
- ZHANG, N.; PENG, H.; LI, Y.; YANG, W.; ZOU, Y.; DOU, H. Ammonia determines transcriptional profile of microorganisms in anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 770-776, 2018.
- ZHANG, S.; CHANG, J.; LIU, W.; PAN, Y.; CUI, K.; CHEN, X.; LIANG, P. ZHANF, X.; WU, Q.; QIU, Y.; HUANG, X. A novel bioaugmentation strategy to accelerate methanogenesis via adding Geobacter sulfurreducens PCA in anaerobic digestion system. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 322-326, 2018.
- ZHANG, W.; WANG, X.; XING, W.; LI, R.; YANG, T. Responses of anaerobic digestion of food waste to coupling effects of inoculum origins, organic loads and pH control under high load: Process performance and microbial characteristics. **Journal of Environmental Management**, v. 279, p. 1-12, 2021.
- ZHAO, S.; WANG, M.; ZHOU, D.; PAN, S. Methane yield predictive model based on the composition of biomass: focus on anaerobic digestion mode and regression method. **BioResources**, v. 15, p. 3850-3858, 2020.
- ZHONG, W.; ZHANG, Z.; LUO, Y.; SUN, S.; QIAO, W.; XIAO, M. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 11177-11182, 2011.

- ZHOU, J.; LIU, W.; DENG, Y.; JIANG, YH.; XUE, K.; HE, Z.; NOSTRAND, J. D. V.; WU, L.; YANG, Y.; WANG, A. Stochastic assembly leads to alternative communities with distinct functions in a bioreactor microbial community. **mBio**, v. 4, p. 1-8, 2013.
- ZHU, K.; DAVIS, C. W.; NOVAK, P. J.; ARNOLD, W. A. Effects of encapsulation on the chemical inhibition of anaerobic hydrogenand methane-producing microbial cells. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 1-11, 2020.
- ZHU, X.; TREU, L.; KOUGIAS, P. G.; GAMPANARO, S.; ANGELIDAKI, I. Converting mesophilic upflow sludge blanket (UASB) reactors to thermophilic by applying axenic methanogenic culture bioaugmentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 332, p. 508-516, 2018.