

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**ALEXANDRE DA SILVA SOUZA**

**DESENVOLVIMENTO DE INÓCULO PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS DA  
INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA INTEGRADA COM A PECUÁRIA PARA  
GERAÇÃO DE BIOGÁS**

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2024**

**ALEXANDRE DA SILVA SOUZA**

**DESENVOLVIMENTO DE INÓCULO PARA O TRATAMENTO DE RESÍDUOS DA  
INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA INTEGRADA COM A PECUÁRIA PARA  
GERAÇÃO DE BIOGÁS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Renata Piacentini Rodriguez

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Souza, Alexandre Da Silva .

Desenvolvimento De Inóculo Para Tratamento de Resíduos da Indústria  
Sucroalcooleira Integrada com a Pecuária para Geração de Biogás /  
Alexandre Da Silva Souza. - Poços de Caldas, MG, 2024.

54 f. : il. -

Orientador(a): Renata Piacentini Rodriguez .

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) -  
Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Biodigestor. 2. Metano. 3. Co-digestão Anaeróbia. 4. Adaptação de  
Inóculo. 5. Enriquecimento de Inóculo. I. Rodriguez , Renata Piacentini,  
orient. II. Título.

ALEXANDRE DA SILVA SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE INÓCULO PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA  
INTEGRADA COM A PECUÁRIA PARA GERAÇÃO DE BIOGÁS

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2024.

Profa. Dra. Renata Piacentini Rodriguez  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Rachel Biancalana Costa  
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Gunther Brucha  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Renata Piacentini Rodriguez, Professor do Magistério Superior**, em 01/03/2024, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1198464** e o código CRC **2595DBBD**.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicio agradecendo minha orientadora, Renata Piacentini Rodriguez, pela oportunidade em participar dessa pesquisa extremamente enriquecedora e que me possibilitou conquistar o título de Mestre. Agradeço a ajuda, auxílio, paciência e amizade que desfrutei contigo ao longo desses meses, que certamente será um período guardado com muito carinho em minhas memórias. Espero poder desfrutar mais bons momentos como esses ao longo da vida.

Obrigado aos amigos Anna Julia, as Jéssicas, Samira, Raiane, Marcos, Marcus, Ju e todos técnicos e professores, que de alguma forma, ajudaram e auxiliaram no desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço em muito, minha parceira de anos, Ju Malta. Sem sua ajuda, confiança, paciência, e amor, os momentos difíceis, certamente seriam muito piores. Com você a vida fica mais leve e amorosa.

Ao meus pais e irmãos, pela confiança de sempre, ajuda e incondicional apoio. Repleto de amor a vocês meus mais profundos agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, contudo o mais importante agradecimento a Jeová Deus, por todas as bênçãos e proteções que possibilitaram a necessária força para caminhar sempre em frente.

## RESUMO

A digestão anaeróbia para tratamento de efluentes mostra ser uma ótima alternativa para a gestão de resíduos agroindustriais, principalmente visando a mitigação de gases de efeito estufa nesses setores e o aproveitamento energético de biogás e metano, auxiliando na consolidação do tratamento; através de biodigestores; de estrumes bovino e vinhaça. Entretanto a mono digestão desses resíduos passam por alguns problemas como a difícil degradação do substrato e o tempo de entressafra nas indústrias sucroalcooleiras, dificultando a produção de biogás e biometano de forma constante ao longo de um ano. A co-digestão surge como uma alternativa para a integração de resíduos e tem como vantagens proporcionar um ambiente mais diversificado em termos de nutrientes, carga orgânica e consórcio microbiano. Dessa forma, essa pesquisa tem o intuito de avaliar melhor a co-digestão entre a vinhaça e estrume bovino para produção de biogás e biometano, avaliando a resposta de um inóculo anaeróbio submetida a sucessivos ensaios de mono- e co-digestão de vinhaça, estrume bovino e a combinação entre esses dois substratos. O experimento ocorreu ao longo de 14 meses e em três fases experimentais, avaliando o potencial bioquímico de metano para cada reator em operação ao longo de todo o experimento. A fase I; fase inicial do experimento; foi operada em 24 reatores, sendo 8 misturas em triplicadas de controle positivo, negativo, mono- e co-digestão entre os substratos acima citados. Nas fases II e III, foi realizada centrifugação para separar a biomassa da fase líquida, seguida do preenchimento de reatores com as misturas correspondentes da fase inicial. Os volumes de biogás obtidos na fase I, não demonstraram diferenças significativas entre a mono- e co-digestões, sendo o volume da mono digestão de estrume bovino ligeiramente maior ao da co-digestão vinhaça + estrume na proporção 90:10%, com valores respectivos de 1275 ml e 1223 ml de biogás produzido. Na fase II, a centrifugação indicou auxílio no aumento da produção de biogás e, conseqüentemente no aumento da produção de biometano em todos reatores, sendo que, os reatores operando com a co-digestão produziram volumes maiores aos das mono-digestões, sendo observado nas co-digestões de vinhaça + estrume (80:20%) seguido do (90:10%) os maiores volumes de biogás, 2486 ml e 1978 ml. A fase III, demonstrou característica diversa na produção de biogás, sendo a fase com menor tempo de operação e respectivamente com menores valores de biogás em todas misturas, onde apenas a co-digestão de vinhaça + estrume bovino (80:20%) obteve bom desempenho, alcançando o valor de 1268 ml na produção de biogás.

**Palavras-chave:** biodigestor; biogás; metano; co-digestão anaeróbia; adaptação de inóculo; enriquecimento de inóculo; vinhaça; estrume bovino.

## ABSTRACT

Anaerobic digestion for effluent treatment proves to be a great alternative for the management of agro-industrial waste, mainly aimed at mitigating greenhouse gases in these sectors and the energy use of biogas and methane, helping to consolidate treatment; through biodigesters; of cattle manure and vinasse. However, the mono-digestion of these residues involves some problems such as the difficult degradation of the substrate and the off-season time in the sugar and alcohol industries, making it difficult to produce biogas and biomethane constantly over the course of a year. Co-digestion appears as an alternative for waste integration and has the advantages of providing a more diverse environment in terms of nutrients, organic load and microbial consortium. Therefore, this research aims to better evaluate the co-digestion between vinasse and cattle manure for the production of biogas and biomethane, evaluating the response of an anaerobic inoculum subjected to successive mono- and co-digestion tests of vinasse, manure bovine and the combination between these two substrates. The experiment took place over 14 months and in three experimental phases, evaluating the biochemical potential of methane for each reactor in operation throughout the entire experiment. Phase I; initial phase of the experiment; was operated in 24 reactors, 8 of which were triplicate mixtures of positive, negative control, mono- and co-digestion between the substrates mentioned above. In phases II and III, centrifugation was performed to separate the biomass from the liquid phase, followed by filling the reactors with the corresponding mixtures from the initial phase. The volumes of biogas obtained in phase I did not demonstrate significant differences between mono- and co-digestions, with the volume of mono-digestion of bovine manure being slightly greater than that of co-digestion vinasse + manure in the proportion 90:10%, with values respectively 1275 ml and 1223 ml of biogas produced. In phase II, centrifugation indicated help in increasing biogas production and, consequently, in increasing biomethane production in all reactors, and reactors operating with co-digestion produced larger volumes than mono-digestions, being observed in co-digestions of vinasse + manure (80:20%) followed by (90:10%) the largest volumes of biogas, 2486 ml and 1978 ml. Phase III demonstrated a different characteristic in the production of biogas, being the phase with the shortest operating time and respectively with the lowest biogas values in all mixtures, where only the co-digestion of vinasse + bovine manure (80:20%) achieved good results. performance, reaching a value of 1268 ml in biogas production.

**Keywords:** biodigester; biogas; methane; anaerobic co-digestion; inoculum adaptation; vinasse; cattle manure.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo cinético de Gompertz para produção de metano .....	24
Figura 2 – Curvas típicas de produção cumulativa de metano. ....	25
Figura 3 – Fluxograma dos procedimentos experimentais da pesquisa.....	26
Figura 4 – Volume acumulado de biogás durante a operação da fase I.....	36
Figura 5 – Volume acumulado de biogás durante a operação da fase II.....	38
Figura 6 – Volume acumulado de biogás durante a operação da fase III.....	39
Figura 7 – Produção de metano na fase I.....	42
Figura 8 – Produção de metano na fase II.....	43
Figura 9 – Produção de metano na fase III.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais de seleção e adaptação do inóculo.....	28
Tabela 2 – Volumes de inoculantes utilizados na fase II.....	29
Tabela 3 – Volumes de inoculantes utilizados na fase III.....	29
Tabela 4 – Caracterização dos substratos em relação a fração de sólidos .....	31
Tabela 5 – Caracterização dos sistemas de mono- e co-digestão no início da fase I.....	32
Tabela 6 – Caracterização dos sistemas de mono- e co-digestão no final da fase III.....	33
Tabela 7 – Volume total acumulado de biogás e pH inicial e final de cada fase .....	34
Tabela 8 – Produção de metano nas fases I, II e III .....	41
Tabela 9 – Percentual de metano no biogás nas fases I,II e III .....	45

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
3.1	DIGESTÃO ANAERÓBIA E A IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS.....	14
3.2	POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM) PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS.....	17
3.3	POTENCIAL DA VINHAÇA NA GERAÇÃO DE BIOGÁS.....	17
3.4	COGERAÇÃO NA PECUÁRIA E PRODUÇÃO DE METANO.....	19
3.5	POTENCIAL DE GERAÇÃO DE METANO NO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO.....	20
3.6	SISTEMAS DE SELEÇÃO E ADAPTAÇÃO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS.....	22
3.7	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE METANO ATRAVÉS DO MODELO DE GOMPERTZ.....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	26
4.2	SUBSTRATOS.....	26
4.3	INÓCULO.....	26
4.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS FASE I.....	26
4.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS FASE II E III.....	28
4.6	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS.....	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DOS SISTEMAS MONO E CO-DIGESTÃO.....	31
5.2	PRODUÇÃO DE BIOGÁS DA FASE I, II E III.....	33
5.3	PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE METANO.....	40
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento nos desastres naturais ocasionados pelo aquecimento global vem gerando grandes problemas sociais, ambientais e econômicos para todos países. A importância de se praticar ações contra esse aquecimento vem se consolidando, principalmente com a realização constante das COP, que vem fomentando o debate de ações mitigadoras contra os efeitos do aquecimento global. Nos últimos anos com a realização da COP 26 e 27 o debate sobre os avanços tecnológicos para auxiliar na mitigação dos impactos ambientais dos gases de efeito estufa cresceu, e nesse contexto, alternativas para o tratamento de efluentes e o aproveitamento energético vem ganhando mais notoriedade no cenário mundial.

A realização do tratamento de efluentes através de reatores operando com digestão anaeróbia tem demonstrado grande eficácia em relação ao resultado final do efluente tratado. Com a implementação e operação desses reatores focado na digestão anaeróbia, consegue converter o substrato primário em biogás, metano e biofertilizantes, porém, esse processo requer alguns controles importantes devido à complexidade na digestão em relação ao mecanismo presente na operação do processo.

A operação de um bom biodigestor (reatores que operam com digestão anaeróbia) requer um bom consórcio microbiano capaz de realizar a digestão do substrato em várias etapas. Pensando no processo final de conversão para biogás e metano, o sistema de consórcios precisará conter microrganismos que contemple as 4 fases da digestão anaeróbia. Iniciando pela fase de hidrólise e seguindo para as fases seguintes de acidogênese, acetogênese e metanogênese, assim sendo convertido o substrato inicial em biogás e metano. O processo envolvendo as 4 fases da digestão anaeróbia, consegue aprisionar os gases de efeito estufa presente no tratamento do efluente, podendo ser aproveitado em usos energéticos como em aquecimento de caldeiras, ou sistemas que envolvam aquecimento de produtos, ou em conversão direta para energia elétrica que utilizam o metano como fonte de calor para as turbinas.

Esse consórcio microbiano para realizar a conversão do substrato principal em biogás requer uma diversidade entre bactérias, arqueias e protozoários. O uso de mais de um substrato pode enriquecer essa diversidade microbiana, ajudando na co-digestão desses substratos e favorecendo a classe de interesse dentro da comunidade microbiana, culminando na produção de metano.

A classe predominantemente responsável para a conversão do substrato em biogás e metano é a classe das metanogênicas, que são divididas em duas classes, as acetotlásticas e

hidrogenotróficas, compostas pelos microrganismos arqueias. Essas arqueias possuem um alto grau de sensibilidade, sendo importante controlar outros fatores para a consolidação delas dentro do consórcio microbiano. Dentro do reator o controle de pH, controle de temperatura e condições básicas de alimentação são determinantes no sucesso da digestão realizada dentro do processo metabólico, principalmente na conversão final em biogás e metano.

A temperatura ideal para essa cultura varia entre 37°C para as mesofílicas e de 60°C para as termofílicas (Stams; Plugge, 2009). O pH precisa estar sempre na faixa neutra entre 6,8 a 8. Esses controles são de extrema importância para a reprodução dos microrganismos presente na digestão anaeróbia, em especial as arqueias. Apesar da versatilidade, as acetoclásticas possuem um crescimento relativamente lento, com tempos de duplicação de 24 e 72 horas, respectivamente, enquanto que as metanogênicas hidrogenotróficas duplicam-se entre 1 e 4 horas. As primeiras podem ser afetadas pela acumulação de hidrogênio, sendo importante a manutenção de baixos níveis tanto de hidrogênio como formiato (Malina ; Pohland , 1992).

Com esse cenário de tratamento alternativo para os efluentes, visando diminuir a emissões de gases de efeito estufa e conseqüentemente gerando um aproveitamento energético, a utilização de biodigestores para o tratamento dos resíduos provenientes na produção de etanol e no setor pecuário vem crescendo, gerando subprodutos e até mesmo minis refinarias. Segundo dados da Conab 2022 foram produzidos 52.424.9 milhões de litros de etanol, gerando um volume altíssimo de vinhaça. Produzida a uma temperatura aproximadamente 107°C na fase de destilação, atingi volumes de 10 a 15 litros de vinhaça a cada litro de etanol produzido. Esse efluente possui uma característica e propriedade específica a partir do tipo de matéria prima utilizada na produção do etanol. (CalegariI, 2017; Elaiuy, 2016). Conforme (Pompermayer; Paula Junior, 2000) 1m<sup>3</sup> de etanol pode produzir até 185 m<sup>3</sup> de biogás, sendo 60% aproveitado como metano.

Em relação ao setor da pecuário, resíduos provenientes da linha verde e vermelha possuem um alto volume de microrganismos capazes de promover a digestão anaeróbia e conseqüentemente a produção de biogás e metano. A prática do confinamento é o que possibilita a utilização e transformação desses resíduos em biogás. Segundo (Santos; Nogueira, 2012), a média de produção diária de estrume bovino no Brasil é de 21 kg/animal. Avaliando esses parâmetros o volume de esterco produzido no Brasil pelo gado confinado, em escala anual seria de aproximadamente 40,3 milhões de toneladas, que pode ser utilizado para produção de metano.

O aumento no uso de resíduos para um aproveitamento energético no Brasil vem se consolidando, conforme estudo do Centro Internacional de Energias Renováveis e Biogás (CIBiogás), nos últimos cinco anos a produção de biogás no Brasil mais que duplicou, sendo produzidos 2,88 bilhões de m<sup>3</sup>/ano para o aproveitamento energético de 2022.

Analisando o potencial de produção de biogás do setor sucroalcooleiro e pecuário, a utilização desses dois substratos pode favorecer na diversidade na comunidade microbiana através de sua co-digestão, auxiliando na manutenção do pH na faixa neutra, evitando a produção de amônia e a acidificação no meio. Como substratos em sistemas de mono digestão, o estrume bovino e a vinhaça possuem grande potencial na produção de biogás e metano, entretanto, existem problemas pertinentes na mono-digestão que podem ser supridas com a co-digestão desses dois substratos, sendo pertinente uma pesquisa mais profunda para avaliar o potencial de produção de biogás e metano na co-digestão entre vinhaça e estrume bovino.

Dessa forma, este projeto avaliou, em escala de bancada, sistemas de mono- e co-digestão de estrume bovino e vinhaça de cana-de-açúcar, com foco na otimização da produção de metano, utilizando como premissa a adaptação de um inóculo metanogênico, através de ensaios de potencial bioquímico de metano em diferentes configurações de mono e co-digestões anaeróbias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto de pesquisa tem como objetivo geral realizar um processo para enriquecimento de um inóculo anaeróbio em sistema de co-digestão entre vinhaça e estrume bovino.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

São objetivos específicos dessa proposta:

- a. Avaliar a produção de biogás e o possível potencial bioquímico de metano utilizando os substratos vinhaça e estrume bovino em sistemas de mono- e co-digestão;
- b. Avaliar o potencial de adaptação do inóculo metanogênico por meio de ensaios de potencial bioquímico de metano sequenciais;
- c. Determinar a produção máxima de metano em função de 8 estratégias adotadas para o enriquecimento do inoculo analisada;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 DIGESTÃO ANAERÓBIA E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

A digestão anaeróbia pode ser definida como sendo um conjunto de processos realizados através de microrganismos, que juntos formam um consórcio microbiano capaz de degradar e consumir a matéria orgânica possivelmente degradável na ausência do gás oxigênio.

Essa operação viabiliza-se através das simbioses dos processos metabólicas realizados no meio ambiente dos consórcios microbianos, em que através de um sistema relativamente complexo e variado, consegue culminar na produção de metano, dióxido de carbono, nitrogênio e sulfeto de hidrogênio. Esse processo metabólico acontece em 4 fases, a fase de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Madingan *et al.*, 2016).

A fase inicial de hidrólise na digestão anaeróbia é responsável em converter a matéria orgânica complexa em produtos mais simples. Os polímeros complexos como proteínas, polissacarídeos, carboidratos e lipídeos são metabolizados, degradados e consumidos através das bactérias hidrolíticas, formando produtos mais simples como os monômeros e oligômeros que resultam no processo final na produção dos açúcares, ácidos carboxílicos de cadeia longa, aminoácidos, peptídeos e glicerol (Santánnia, 2010). Nesse momento do processo metabólico é possível encontrar vários tipos de hidrólise de forma simultâneas, como a hidrólise de glicosídeos que geram os açúcares e a hidrólise de proteínas que formam os aminoácidos.

No processo metabólico seguinte ocorre a fase fermentativa acidogênica, realizada através dos microrganismos como bactérias acidogênicas, fungos e protozoários. Os produtos gerados na fase da hidrólise seguem por uma nova rota de consumo e degradação realizadas pelos os microrganismos ativos presentes na fermentação acidogênica, que auxilia na formação de novos subprodutos da classe dos ácidos graxos de cadeia longa, como os ácidos orgânicos voláteis, álcoois, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio. Nesse instante o controle metabólico através do consumo e degradação do hidrogênio realizadas pelas metanogênicas hidrogenotróficas na fase da hidrólise é determinante, visto que a alta concentração de hidrogênio pode elevar o acúmulo de ácidos orgânicos, ocasionando uma acidificação do pH no meio e prejudicando o balanço metabólico do consórcio de microrganismos. Como as bactérias acidogênicas possuem um crescimento rápido, com tempo médio de duplicação ocorrendo no intervalo mínimo de 30 minutos, o desbalanceamento nessa etapa pode ocorrer facilmente (Chernicharo, 2007).

Prosseguindo com os processos metabólicos anaeróbios, os produtos presentes na fase da acidogênicas continuam sua rota metabólica de consumo e degradação na fase acetogênica culminando nos produtos de acetato e hidrogênio. Neste momento do processo a fase acetogênica é termodinamicamente desfavorável, promovendo a redução nos prótons e conseqüentemente oxidando e transformando os produtos fermentativos gerados como os ácidos orgânicos voláteis na fase anterior em produtos como o acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Devido à complexidade dos produtos degradados e consumidos, o controle termodinâmico torna-se imprescindível para a eficácia da digestão anaeróbia nessa fase, visto que o processo torna-se termodinamicamente favorável em baixas concentrações de H<sub>2</sub> e dependente de uma boa associação sintrófica entre microrganismos consumidoras de hidrogênio ou redutoras de sulfato.

Desta forma as acetogênicas desempenham um papel muito importante na digestão anaeróbia devido ao acetato gerado pela sua fermentação, conseqüentemente favorecendo maior volume na produção do metano.

Por fim, na fase metanogênica ocorre a descarboxilação do acetato pelas metanogênicas acetoclásticas e a hidrogenação do dióxido de carbono pelas metanogênicas hidrogenotróficas, assim produzindo metano pela digestão anaeróbia (Madingan T. Michael, *et al.* 2016).

A comunidade das arqueias metanogênicas necessita de um alto grau de controle nos fatores físico-químicos presentes no processo metabólico da digestão anaeróbia, onde a manutenção do pH neutro, da temperatura mais quente e na formação de compostos inibidores ao processo reprodutivo das arqueias interferem na consolidação operacional das metanogênicas no consórcio microbiano, afetando diretamente no volume final de metano produzido.

O grupo mais versátil entre as metanogênicas são as acetoclásticas, sendo capaz de utilizar além de acetato, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, metanol e metilaminas como substrato (Monteggia, 1991). Apesar da versatilidade, as acetoclásticas possuem um crescimento relativamente lento, com tempos de duplicação de 24 e 72 horas, respectivamente, enquanto que as metanogênicas hidrogenotróficas duplicam-se entre 1 e 4 horas. As primeiras podem ser afetadas pela acumulação de hidrogênio, sendo importante a manutenção de baixos níveis tanto de hidrogênio como formiato (Malina; Pohland, 1992).

A ocorrência da digestão anaeróbia só é possível devido a sintrofia microbiana dentro do biodigestor, onde um consorcio microbiano é necessário para conseguir contemplar todas fases metabólicas. Para iniciar a digestão anaeróbia é necessária uma comunidade de bactérias hidrolíticas como por exemplo, bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Lachnospira*, *Selenomonas*

*sp.*, entre outros. O mesmo ocorre na fase acidogênica, que necessita de microrganismos como *Butirivibrio*, *Eubacterium*, *Bacillus sp.*, para gerar a fermentação necessária para produzir os ácidos graxos de cadeia longa. As degradações desses ácidos graxos necessitam de bactérias acetogênicas como *Syntrophomas wolinni S.*, *Clostridium bryantii*, *Acetobacterium woddii*, entre outras. Bactérias capazes de digerir os ácidos graxos e produzir hidrogênio e acetato dentro do digestor anaeróbio. (Chernicharo, 2007).

Por fim, a conversão do acetato e hidrogênio para metano depende de duas classes de metanogênicas, as metanogênicas hidrogenotróficas e as acetoclásticas. As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas como as *Methanobacterium sp.*, *Methanobrevibacter sp.* consomem o hidrogênio e controlam a concentração do mesmo, favorecendo a termodinâmica dentro do reator. Já as metanogênicas acetoclásticas como *Methanosarcina sp.*, *Methanothrix sp.*, são responsáveis pela digestão do acetato e pela maior fração do substrato presente no meio convertido em metano.

Essa classe de microrganismos possui um alto grau de dependência da cadeia alimentar complexa presente nas outras fases da digestão anaeróbia, em que uma simbiose desequilibrada pode gerar um meio desfavorável para as metanogênicas, possuindo um alto grau de sensibilidade ao meio comparada com os outros microrganismos presentes na digestão anaeróbia, uma vez que a composição dessa classe é predominante de arqueias.

As arqueias metanogênicas são mais sensíveis fisiologicamente comparadas com as bactérias presentes nas outras fases e apresentam uma maior sensibilidade para meios ácidos. A temperatura ideal para essa cultura varia entre 37°C para as mesofílicas e de 60°C para as termofílicas (Stams; Plugge, 2009).

Devido à complexidade envolvida do processo anaeróbio, é importante que haja um controle da cultura de microrganismos responsáveis pela conversão da matéria orgânica, garantindo assim a eficiência do sistema. Além disso, outros fatores afetam o processo de digestão anaeróbia como, sobrecarga hidráulica ou orgânica, temperatura, pH, alcalinidade, existência de contaminantes e compostos tóxicos, inorgânicos e orgânicos (Elaiuy, 2016)

Analisando a digestão anaeróbia como uma fonte de energia renovável, a conversão de um substrato de interesse em metano vai depender diretamente do desempenho desse consórcio microbiano, principalmente em relação as arqueias metanogênicas. De acordo com (Abdelsalam *et al.*,2017a), algumas tentativas foram realizadas para aumentar a produção de biogás estimulando a atividade microbiana usando vários aditivos biológicos e químicos em diferentes condições operacionais. Um fator de extrema importância para a biodigestão anaeróbia é a presença de micronutrientes, condição fundamental para a produção de CH<sub>4</sub>,

sendo o efeito da adição de determinados compostos que serve como co-fatores enzimáticos, por exemplo, ferro, molibdênio e selênio, relacionado a melhorias no rendimento de CH<sub>4</sub> (Azim *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2017).

### 3.2 POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM) PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

A avaliação e quantificação de produção de metano através da ferramenta PBM tem como premissa indicar a capacidade máxima de produção de biogás e metano a partir de um ou mais substratos.

A operação de PBM é definida como sendo a máxima produção de metano realizada por um consórcio de microrganismos anaeróbios, realizadas em condições controladas de laboratórios, em condições que garantam uma presença superior de biomassa perante a quantidade de substrato, em termos de sólidos voláteis totais (SVT).

Os ensaios de PBM tem como intuito conseguir medir a velocidade de produção de metano em função da concentração de sólidos voláteis provenientes do inóculo, onde a velocidade máxima específica de formação de gás metano é obtida pelo valor máximo da função de  $dV/dT$ , ou seja, o valor máximo de volume de biogás produzido em um intervalo de tempo (Florentino *et al.*, 2010).

### 3.3 POTENCIAL DA VINHAÇA NA GERAÇÃO DE BIOGÁS

O Brasil possui um enorme potencial para a geração de biogás proveniente dos resíduos gerados na produção do etanol. Esse potencial pode ser estimado levando em consideração os dados do terceiro levantamento de safra realizado pela Conab, no ano de 2022. A produção de cana de açúcar chegou a 598.345,4 mil toneladas, proporcionando uma produção de quase 52.424,9 milhões de litros de etanol e gerando um alto volume de vinhaça, principal subproduto proveniente da produção do etanol.

A vinhaça é um subproduto que possui uma característica de resíduo orgânico líquido, com coloração escura e odor forte. Contém um pH predominantemente ácido e com uma alta concentração de nutrientes como cálcio, potássio e magnésio. Produzida a uma temperatura aproximadamente 107°C na fase de destilação, atinge volumes de 10 a 15 litros de vinhaça a cada litro de etanol produzido. Esse efluente possui uma característica e propriedade específica a partir do tipo de matéria prima utilizada na produção do etanol. (Calegari, 2017; Elaiuy, 2016).

Com as características únicas presente na vinhaça, o efluente acaba sendo submetido a diversas forma de tratamentos como a produção de proteínas, rações animais e o uso agrícola como parte da adubação mineral (fertirrigação) (CalegariI, 2017). Neste sentido, a prática mais usada atualmente para disposição da vinhaça é a fertirrigação, que vem gerando grandes impactos ambientais ao longo dos anos, principalmente devido ao seu conteúdo orgânico de característica ácida e a presença de sólidos dissolvidos. Infelizmente o uso indiscriminado dessa técnica vem maximizando os efeitos negativos, provocando a salinização do solo, lixiviação de metais e sulfato e contaminação de águas subterrâneas (Fuess *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2015).

Outro tratamento adotado em ascendência é a utilização da digestão anaeróbia no tratamento da vinhaça. Essa linha de tratamento de efluente pode contribuir consideravelmente na redução da demanda química de oxigênio (DQO) e ainda proporcionar uma produção de metano a partir do biogás gerado, fornecendo uma fonte de produção de energia limpa dentro das plantas produtoras do etanol. Operacionando reatores anaeróbios, o tratamento gera baixo volume de lodo residual, necessita de menos aditivos comparado com o tratamento aeróbio, e o biodigerido consegue preservar o potencial do fertilizante, servindo ainda como biofertilizante de baixo impacto ambiental.

A capacidade de geração do biogás no tratamento da vinhaça depende do volume final de etanol produzido, podendo alcançar um volume de 185 m<sup>3</sup> de biogás a partir da produção de 1 m<sup>3</sup> de etanol, onde 60% desse volume de biogás gerado é metano. As características caloríficas do biogás vão depender da concentração do metano e o grau da umidade do gás, sendo adotado em média de 5.500 kcal/m<sup>3</sup> quando considerado o biogás seco com 60% de metano (Conforme (Pompermayer; Paula Junior, 2000).

A adoção de reatores anaeróbios dentro do sistema de tratamento da vinhaça consegue trazer benefícios na cogeração de subprodutos na linha de produção, possibilitando a geração de eletricidade verde, calor ou como combustível de veículos. Com a energia direta produzida, consegue gerar o biodigerido (ou digestato) que pode ser transformado em fertilizante concentrado ou produtos de fibra, ou seja, produtos adequados para reutilização.

Desta forma o digestato pode ser utilizado para fertilização do cultivo de biomassa, resultando em ganhos econômicos no setor da cana por reduzir a demanda de fertilizantes inorgânicos (Holm-Nielsen *et al.*, 2009). A disponibilidade da fração biodegradável presente nos substratos provenientes da indústria sucroenergética (relacionada à biodigestão anaeróbia com conseqüente produção de CH<sub>4</sub>) ainda representa um gargalo para este campo científico (Janke *et al.*, 2015).

### 3.4 COGERAÇÃO NA PECUÁRIA E PRODUÇÃO DE METANO

A importância de uma produção mais sustentável dentro da pecuária tem sido uma prática cada vez mais cobrada pelo seu nicho de consumidor, seja nacional ou internacional. Desta forma, a indústria pecuária brasileira vem desenvolvendo técnicas mais apuradas para conseguir aumentar a produção com espaços menores, através de avanços técnicas de manejo e produção que possibilita uma expansão na linha produtiva pecuária, viabilizando a transformação de resíduos antes descartados em subprodutos com valor agregado de comercialização.

Para alcançar essa linha de produção mais lucrativa, a técnica de confinamento, controle e manejo dos animais surge como forte aliado para conseguir melhorar a eficiência produtiva e na mitigação do impacto ambiental. Conforme o censo de confinamento de 2022 (DMS), cerca de 6,95 milhões de animais bovinos foram confinados. Esta prática vem aumentando no setor pecuário mundial, exatamente devido aos benefícios no impacto econômico e ambiental de forma positiva.

Com o aumento dessa prática, também vem aumentando a preocupação em relação aos acúmulos de dejetos e seus possíveis impactos dentro dos solos, nos recursos hídricos, na poluição do ar e de outras questões sanitárias (DSM, 2022). Segundo (Santos; Nogueira, 2012), a média de produção diária de estrume bovino no Brasil é de 21 kg/animal. Avaliando esses parâmetros o volume de esterco produzido no Brasil pelo gado confinado, em escala anual seria de aproximadamente 40,3 milhões de toneladas.

Na produção confinada, os resíduos orgânicos provenientes podem incluir estrume bovino, urina, rumem animal devido ao abate, retalhos de couro, sangue e materiais cárneos, sendo gerado em média de 20 a 50 kg/cabeça abatida (Nunes *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 1993), e sua caracterização varia conforme a sua origem.

A dieta bovina ao longo da engorda do boi acaba gerando um desequilíbrio na caracterização do estrume, visto que cada produtor acaba entregando ao seu gado uma dieta alimentar diferente de outro produtor. Ao ocorrer o confinamento, essa variação da dieta acaba impactando diretamente na caracterização do estrume. Dentro do curral, os dejetos como esterco e urina são denominados como “linha verde” e possui um grande impacto ambiental negativo. A manutenção da limpeza dos currais acaba gerando um alto volume de água poluída, resultando em um grande volume de efluentes a ser tratados (Nunes *et al.*, 2017). Os resíduos proeminentes do abate, como o sangue, recebem o nome de “linha vermelha” e também acabam gerando um enorme impacto ambiental negativo.

As duas linhas de resíduo gerado possuem um alto potencial poluidor, podendo impactar águas subterrâneas e superfícies devido a sua alta concentração de matéria orgânica, nutrientes e sua característica de degradação orgânicas como odor ruim e emissões de gases poluidores para atmosférica (Gonçalves, 2010; Mathias, 2014; Othman *et al.*, 2013).

Esse alto volume de efluentes possui uma alta capacidade de geração de biogás e, assim como a vinhaça, possui um alto valor energético quando tratado da maneira correta (Mathias, 2014). A utilização da digestão anaeróbia no tratamento desses resíduos acaba sendo uma técnica alternativa importante para alcançar uma produção mais sustentável, visto o seu alto potencial de impactar o meio ambiente devido a matéria orgânica presente no efluente. (Albanez *et al.*, 2016; Moraes *et al.*, 2015).

### 3.5 POTENCIAÇ DE GERAÇÃO DE METANO NO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO

Com o crescimento da demanda energética no Brasil, em especial no setor do agronegócio, a pratica de aproveitamento e transformação dos resíduos rurais da cadeia produtiva para a geração de biogás vem se consolidando em território nacional, por ser uma fonte alternativa de energia mais sustentável e barata. O uso de biomassa como matéria prima para geração de energia alternativa vem crescendo no cenário nacional através dos avanços nas regulamentações de produção e uso de energia elétrica descentralizada afetando de forma positiva a vida financeira de vários setores produtivos.

O governo nacional em 2015 sancionou uma lei que possibilita o sistema de créditos (*net metering*) ou a comercialização da energia na rede (Lei nº 13.203/2015; Portaria nº 65/2018), opções que vem fomentando o potencial de geração do biogás no Brasil. A utilização do biogás gerado no tratamento anaeróbio da vinhaça e nos resíduos pecuários pode servir como alternativa de energia renovável e sustentável. Pode ser utilizado na substituição dos combustíveis não renováveis utilizados na planta de operação, como o diesel, carvão, gasolina, entre outros, utilizados para esquentar caldeiras e abastecer as frotas internas, gerando uma produção mais limpa, menos impactante ambientalmente e contribuindo no aumento econômico devido a diminuição nas perdas geradas na produção (Moraes *et al.*, 2015).

A produção de biogás dentro de uma linha de produção pode trazer muitas vantagens, como (Oliveira *et al.*, 2017) afirmam, destacando a (i) diminuição no lançamento de gases de efeito estufa na atmosfera, devido a sua bioeletricidade neutra em carbono, promovendo o desenvolvimento de energia limpa; (ii) a redução nas perdas no sistema de transmissão, devido a concentração das usinas sucroalcooleiras estarem instaladas principalmente na região Centro-

sul do país, região de maior consumo elétrico nacional; (iii) a eletricidade gerada pode ser escoada diretamente para rede de distribuição; (iv) o uso eficiente dos insumos de origem nacional.

Conforme estudos do Centro Internacional de Energias Renováveis e Biogás (CIBiogás), nos últimos cinco anos a produção de biogás no Brasil mais que duplicou, sendo produzidos 2,88 bilhões de m<sup>3</sup>/ano para o aproveitamento energético de 2022. Ocorreu um aumento de 110% em relação ao volume produzido no ano de 2018.

O número de plantas em operação em território nacional totalizou 885 unidades em 2022, sendo um aumento de 15% com 114 novas plantas comparada com o ano de 2021. Entretanto esse aumento ainda significa apenas 26% do potencial de curto prazo de produção de biogás no país, que está estimado em 10,8 bilhões de m<sup>3</sup>/ano.

O panorama nacional de biogás no ano de 2022 foi de um crescimento forte no estado de Minas Gerais, sendo o estado com mais planta de biogás em operação, 274 unidades. Em seguida vem o estado do Paraná de 198 plantas e Santa Catarina com 82 plantas em operação.

Os estados que obtiveram um crescimento mais expressivo no ano de 2022 em relação ao ano de 2021 foi São Paulo com 21% de aumento nos números de plantas existentes, seguido do estado do Paraná com crescimento de 18% e o estado de Goiás com crescimento de 16%.

Nesse cenário de elevadas expectativas, os substratos provenientes da atividade sucroalcooleira como vinhaça, podem ser considerados como matéria-prima para geração de produtos de valor agregado, como o biometano (i.e., biogás contendo 96,5% de CH<sub>4</sub> v/v com características similares ao gás natural). O biogás pode ser um facilitador do desenvolvimento de biorrefinarias, além de melhorar o valor do portfólio de produtos (Hagman, Linda *et al*, 2017).

Entre as aplicações energéticas do biogás, a extração e utilização do biometano destacou-se com um crescimento de 82% nos números de plantas em operações no país em 2022, totalizando 20 plantas a mais entrando em operação no Brasil. A capacidade de conversão dessas plantas chega em 22% do biogás produzido no Brasil, com destino principal de geração de energia elétrica.

A principal destinação do biogás produzido ainda continua sendo no uso para energia elétrica, correspondendo 86% das plantas em operações de biogás no país, sendo o setor agropecuário o principal gerador, seguido dos aterros sanitários.

Com o crescimento da crise energética presente no mundo e, conseqüentemente, a crise climática gerada pelas grandes emissões de gases de efeito estufa, a utilização desses resíduos

para geração de biogás e de metano auxilia na prática operacional de sustentabilidade das indústrias.

A partir da COP 26, a utilização desses resíduos e a prática do confinamento desses gases gerados para o uso como biogás, pode gerar além de economia financeira com energia, a promoção da prática sustentável e a possível comercialização dos créditos de carbono gerado nesse tratamento de efluente. A grande vantagem da biodigestão anaeróbia consiste na importância do seu produto principal, o metano ( $\text{CH}_4$ ), que pode ser utilizado de forma direta ou indireta, tendo a combustão em caldeiras para geração de calor e a combustão em motores para geração de energia elétrica como exemplos, respectivamente (Gunaseelan, 2009).

### 3.6 SISTEMAS DE SELEÇÃO E ADAPTAÇÃO DE CONSÓRCIO MICROBIANOS

A matéria orgânica usada como insumo para a digestão anaeróbia dentro de um biodigestor pode possuir diversas características, favorecendo a estabilidade e a predominância de uma determinada comunidade microbiana dentro do consórcio microbiano presente no biodigestor. O controle desse crescimento populacional microbiano pode determinar as características do processo presente dentro do biodigestor e interferir na geração do produto final de interesse.

Em relação a produção de metano, as arqueias metanogênicas constituem o último passo na cadeia trófica de decompositores que degradam a matéria orgânica em ambientes livres de oxigênio (Thauer *et al.*, 2008). A etapa da metanogênica acaba sendo limitante dentro da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos (Braun *et al.*, 2010).

Como as bactérias possuem tempos de duplicação rápidos dentro da digestão anaeróbia, ocorre o favorecimento na produção no substrato para as arqueias, que por sua vez possuem crescimento lento. Essa fase é uma fase sensível ao desequilíbrio (Briones; Raskin, 2003), provavelmente devido à falta de redundância funcional entre os metanogênicos (Curtis; Sloan, 2004).

As altas concentrações de ácidos graxos voláteis, sais, amônia e metais pesados podem ser inibitórias para as metanogênicas (Karri *et al.*, 2006.), fato comum na falha de funcionamento dos reatores para geração de metano, principalmente, quando o processo metabólico acaba produzindo amônia que inibe a metanogênese através da difusão nas células e indução subsequente de um aumento de pH intracelular ou inibição enzimática (Braun *et al.*, 2010).

A importância de uma boa inoculação do consórcio microbiano na digestão anaeróbia possibilita um tratamento de efluentes com operações relativamente baratas e simples em relação ao reator projetado. Analisando o potencial da vinhaça para geração de biometano, integrado com a capacidade dos estrumes bovinos de gerarem energia, existem vários problemas que precisam ser superados.

A tecnologia presente na digestão anaeróbia precisa superar os problemas como baixo pH, teor de nitrogênio ou presença de compostos inibidores (Petta *et al.*, 2017). Encontrar a razão entre os substratos para uma co-digestão no reator é um fator chave que pode influenciar diretamente a produção de biogás (Wojcieszak *et al.*, 2017).

Reatores anaeróbios são comumente inoculados com consórcios metanogênicos, adaptados a nova alimentação, levando a redução na produção do biometano (Petta *et al.*, 2017). Diferentes estudos avaliam a adaptação dos inóculos provenientes de dejetos termofílicos à co-digestão com diferentes co-substratos (Zahedi *et al.*, 2016). Devido à complexidade presente no processo termofílico, é necessário um bom controle de pH, para manter em níveis acima de 7,2. Abaixo desse valor, é considerado um ambiente inibitório ao crescimento metanogênico (Yang *et al.*, 2019).

A relação ideal entre a vinhaça e o estrume bovino deve otimizar a relação carbono com o nitrogênio, que é benéfico para população microbiana e para produção de AGV e, posteriormente, a produção do biometano (Feng *et al.*, 2009). Estudos demonstram que a adição de gorduras e óleos provenientes de resíduos alimentares podem melhorar a atividade metanogênica. O aumento observado na atividade relativa de metanogênicas hidrogenotróficas e oxidantes sintróficas de ácidos graxos com crescente produção de biogás destacam o significado da sintrofia na co-digestão (Yamrot *et al.*, 2017).

O processo da digestão anaeróbia dentro de um reator batelada consiste em um sistema que não ocorre o fluxo de entrada ou saída a partir do processo montado, os elementos ali encontrados são expostos a um tempo de permanência igual ao do substrato (Von Sperling *et al.*, 2014). A comunidade bacteriana pode conseguir aumentar sua população quando o reator em batelada entra em operação e o substrato começa a ser consumido.

O crescimento é caracterizado por quatro fases sequenciais e distintas. A fase inicial chamada de lag(retardo) é necessária para que os microrganismos se aclimatem dentro do ambiente do reator, antes da divisão celular e a produção de biomassa. Em seguida, na fase de crescimento exponencial, as células bacterianas tendem a se multiplicar a taxas máximas. Na terceira fase, ocorre o momento estacionário, que a concentração de biomassa tende a permanecer constante ao longo do tempo, e finalizando a última fase, a morte, em que o

substrato foi consumido e começa a ocorrer um declínio da concentração de biomassa (Metcalf; Eddy, 2016).

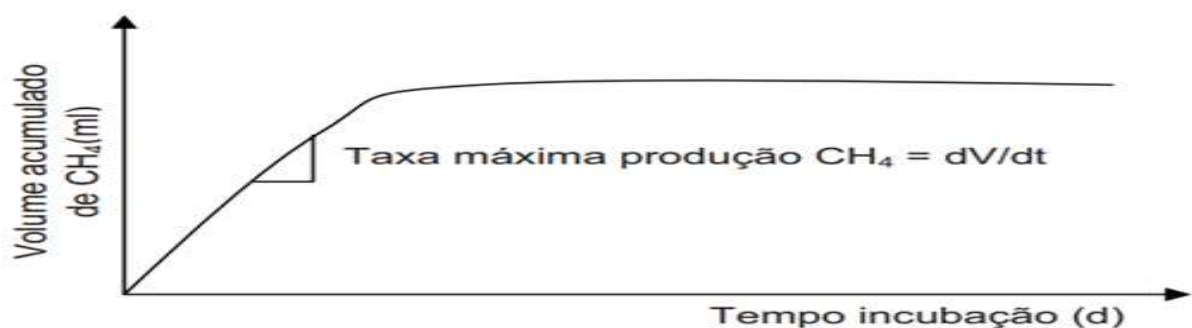
O ciclo de vida dos microrganismos dentro da digestão anaeróbia influencia diretamente na eficiência da remoção de poluentes e contaminantes. A eficiência do sistema depende diretamente da capacidade metabólica dos microrganismos presentes no sistema, e as condições ambientais como temperatura, pH do meio e volume de substrato ideal conforme o equilíbrio do processo metabólico constituído.

### 3.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE METANO ATRAVÉS DO MODELO DE GOMPERTZ

A produção de metano em reatores anaeróbios passa por quatro fases distintas: lag, crescimento exponencial, momento estacionário e declínio. Essas fases estão intimamente ligadas ao desenvolvimento da biomassa das arqueias metanogênicas e à subsequente produção de metano.

Na fase inicial lag o processo de adaptação e crescimento depende das arqueias metanogênicas, necessitando de tempo para se adaptarem ao substrato e alcançarem o equilíbrio metabólico. Uma vez conquistada essa adaptação e equilíbrio dentro da comunidade, ocorre uma fase de crescimento exponencial, onde a produção de metano atinge seu pico. As arqueias passam por um ciclo de vida, chegando ao declínio e eventual morte, a dinâmica desse ciclo pode ser elucidada pela relação entre o volume acumulado de metano ao longo do tempo de incubação, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Modelo cinético de Gompertz para avaliação da produção de metano



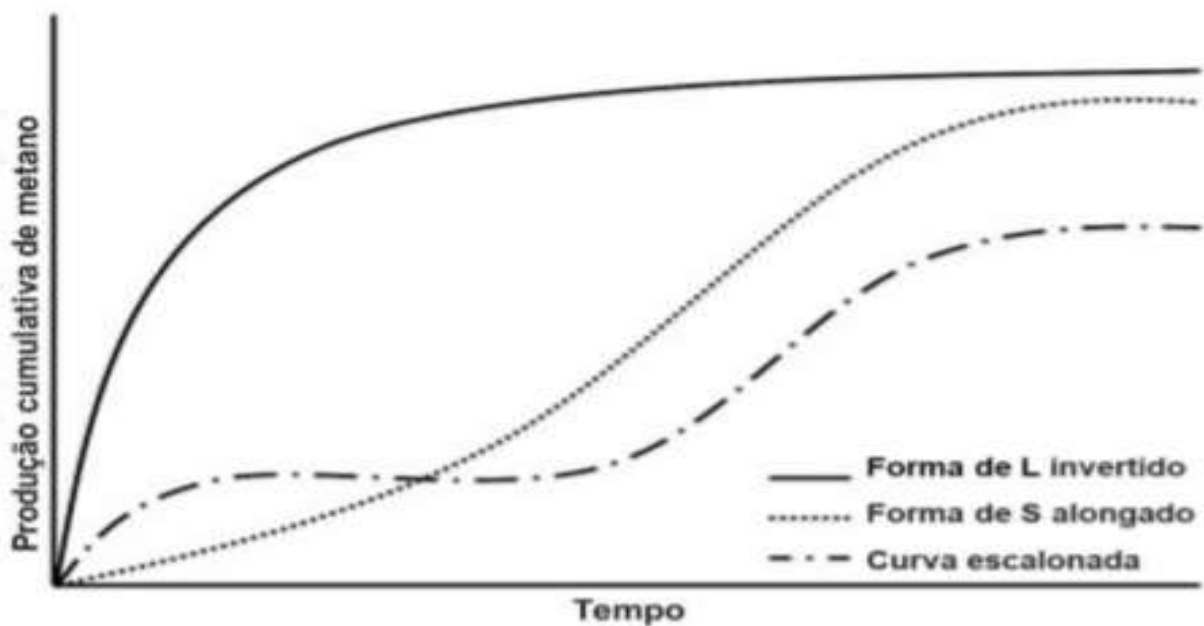
Fonte: Adaptada de Ware Power, 2017.

Um bom reator com foco em produção de biometano precisa trabalhar na adaptação dos inóculos para minimizar ao máximo de tempo a fase inicial lag, possibilitando uma adaptação

mais rápida dos microrganismos e, conseqüentemente, uma produção mais rápida de biometano e uma maior taxa de volume produzido de biometano ao longo do ciclo de vida da arqueias metanogênicas.

A degradação dos substratos varia conforme o composto do substrato, desta forma obtendo uma degradação mais simples ou mais complexa conforme o composto. Essa variação na degradação acaba gerando algumas curvas características no gráfico de produção do metano. A degradação simples normalmente apresenta uma curva de produção em forma de L invertido. Uma degradação mais complexa gera uma curva de formato diferenciado e fácil de visualizar. E em uma degradação mais lenta de substrato devido a inibição do crescimento celular, gera uma curva sigmoidais ou em degraus (Ware, Power, 2017).

Figura 2 - Curvas típicas de produção cumulativa de metano



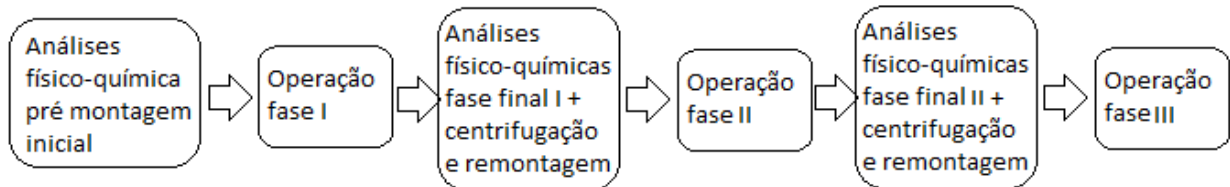
Fonte: Adaptada de Ware Power, 2017.

Considerando que ainda existem lacunas no entendimento da resposta adaptativa de inóculos em sistemas de produção de metano, este trabalho avaliou a capacidade máxima de produção de biogás e metano em sistemas de mono digestão de estrume bovino e vinhaça e em sistemas de co-digestão combinando diferentes proporções de ambos os substratos. A melhor hipótese desta dissertação é que sistemas metanogênicos sequenciais de mono- e co-digestão resultam em aumento (H1) ou diminuição (H2) da produção de biogás e do conteúdo de metano do biogás, seja por adaptação, no primeiro caso (H1), ou por um esgotamento populacional, no segundo caso (H2).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos experimentais da pesquisa



Fonte: Produção do próprio autor.

### 4.2 SUBSTRATOS

Os experimentos de adaptação do inóculo foram realizados em sistemas de mono- e co-digestão, para os substratos vinhaça e estrume bovino. A vinhaça foi utilizada como substrato principal e foi coletada em uma usina de cana-de-açúcar na cidade de Iracemápolis – SP. O estrume bovino foi adicionado como co-substrato e foi coletado em um frigorífico e abatedouro localizado na cidade de Poços de Caldas – MG. Os substratos foram caracterizados em relação ao seu teor de sólidos totais, sólidos totais voláteis e sólidos totais fixos, de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Apha, 2012).

### 4.3 INÓCULO

O inóculo selecionado foi proveniente de reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) tratando efluentes de abatedouro de aves (Tietê-SP), sendo caracterizado em relação ao seu teor de sólidos totais, sólidos totais voláteis e sólidos totais fixos, de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Apha, 2012), expressos na tabela 4.

### 4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS FASE I

Os experimentos de desenvolvimento do inóculo foram realizados em escala laboratorial, utilizando-se frascos de vidro borossilicato de graduação de 250 ml com tampa de rosca e septo de borracha para vedação. Em cada reator foi adicionado 125 ml de volume

líquido, composto por uma mistura de vinhaça e estrume bovino, de acordo com as condições experimentais propostas (Tabela 1). O volume de *headspace* foi de 125 ml e destinado ao acúmulo de biogás. A concentração de biomassa no interior de cada reator foi definida em função da metodologia VDI4630 (Deutscher, 2006) que preconiza a realização de ensaios de potencial bioquímico de metano na proporção 2:1 em termo de sólidos voláteis totais (SVT) para o inóculo e substrato, respectivamente. Testes de controle positivo e negativo foram realizados na presença de celulose microcristalina como único substrato (controle positivo) e somente na presença de inóculo (controle negativo).

Os reatores foram operados inicialmente a 30° C com agitação manual realizada uma vez ao dia durante o período experimental. Na etapa inicial de montagem dos reatores, todos foram submetidos a um fluxo gasoso de N<sub>2</sub> por 5 minutos para assegurar a presença de um ambiente anaeróbio, sendo realizados testes em triplicatas.

O pH dos reatores foi corrigido para 7,0 com solução de NaOH 0,05 M, quando necessário e de acordo com as exigências experimentais de cada etapa. O pH foi determinado em função dos requisitos das arqueias metanogênicas, buscando otimizar a atividade de produção de metano e adição mínima de alcalinizante. As misturas com pH entre 7 e 8,3 não foi realizada correção do pH.

O procedimento para seleção, adaptação e enriquecimento do inóculo foi baseado em repiques consecutivos para cada condição experimental analisada, sendo feito uma centrifugação ao término da fase experimental I e II, para cada condição operacional analisada, a fim de separar a fase sólida (biomassa) da fase líquida e, reutilizando a biomassa resultante como inoculante do sistema correspondente da fase experimental seguinte II e III. Os respectivos volumes de cada condição experimental estão expressos nas tabelas 2 e 3.

O controle dos parâmetros de acompanhamento de adaptação do inóculo foram baseados na produção do volume total de biogás e a composição de metano, bem como o consumo de matéria orgânica, em termos de demanda química de oxigênio (DQO) e a produção de alcalinidade.

As condições experimentais avaliadas na seleção e enriquecimento do inóculo estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições experimentais de seleção e enriquecimento do inóculo

<i>Condição</i>	<i>Substrato</i>	<i>Co-substrato</i>
Controle (-)	Ausente	Ausente
Controle (+)	Celulose	Ausente
2%	Vinhaça (98% SVT)	Estrume (2% SVT)
5%	Vinhaça (95% SVT)	Estrume (5% SVT)
10%	Vinhaça (90% SVT)	Estrume (10% SVT)
20%	Vinhaça (80% SVT)	Estrume (20% SVT)
Vinhaça	Vinhaça (100% SVT)	Ausente
Estrume	Ausente	Estrume (100% SVT)

Fonte: Produção do próprio autor.

#### 4.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS FASE II E III

Os experimentos de adaptação e enriquecimento do inóculo continuaram a ser realizados em escala laboratorial na fase II e na fase III, utilizando-se frascos de vidro borossilicato de 250 ml com tampa de rosca e septo de borracha para vedação. Para iniciar a fase II e a fase III, foi realizado uma centrifugação utilizando uma centrífuga modelo Solab SL 700 com 3500 de RPM por 20 minutos para cada reator, resultando na separação da fração líquida da fração sólida. Em seguida, foi retirada a fração líquida, restando apenas o volume da fração sólida que foi usada como inoculante. Os volumes dos inóculos estão descritos nas tabelas 2 e 3.

Dando sequência ao experimento foi adicionado a cada reator 125 ml de volume líquido, composto por uma mistura de vinhaça e dejetos bovinos, de acordo com as condições experimentais propostas (Tabela 1). O volume de *headspace* foi de aproximadamente 125 ml destinado ao acúmulo de biogás.

Devido as condições climáticas os reatores foram mantidos e operados a 35° C com auxílio de uma estufa térmica, com agitação manual realizada a cada coleta de biogás. Todos os reatores foram submetidos a fluxo de gás N<sub>2</sub> por 5 min para assegurar a presença de ambiente anaeróbio ao início de cada fase, sendo os testes realizados em triplicatas.

O pH dos reatores foi corrigido para 7,0 com solução de NaOH 0.05M, quando necessário e de acordo com as exigências experimentais de cada etapa. O pH foi determinado em função dos requisitos das arqueias metanogênicas, buscando otimizar a atividade de produção de metano e adição mínima de alcalinizante. Para as misturas com pH entre 7 e 8,3 não foi realizada correção do pH.

Tabela 2 - Volumes de inoculantes utilizados na fase II

<i>Amostras</i>	<i>Volume(ml)</i>	<i>Amostras</i>	<i>Volume(ml)</i>
Controle (-) (1)	20	98:2% (1)	10
Controle (-) (2)	20	98:2% (2)	2
Controle (-) (3)	20	98:2% (3)	2
Controle (+) (1)	40	95:5% (1)	30
Controle (+) (2)	40	95:5% (2)	30
Controle (+) (3)	40	95:5% (3)	30
Vinhaça (1)	20	90:10% (1)	40
Vinhaça (2)	40	90:10% (2)	40
Vinhaça (3)	40	90:10% (3)	35
Estrume Bovino (1)	40	80:20% (1)	35
Estrume Bovino (2)	30	80:20% (2)	40
Estrume Bovino (3)	30	80:20% (3)	40

Fonte: Produção do próprio autor.

Tabela 3 - Volumes de inoculantes utilizados na fase III

<i>Amostras</i>	<i>Volume(ml)</i>	<i>Amostras</i>	<i>Volume(ml)</i>
Controle (-) (1)	25	98:2% (1)	10
Controle (-) (2)	15	98:2% (2)	10
Controle (-) (3)	12	98:2% (3)	12
Controle (+) (1)	20	95:5% (1)	40
Controle (+) (2)	30	95:5% (2)	20
Controle (+) (3)	25	95:5% (3)	20
Vinhaça (1)	20	90:10% (1)	35
Vinhaça (2)	20	90:10% (2)	25
Vinhaça (3)	20	90:10% (3)	20
Estrume Bovino (1)	40	80:20% (1)	30
Estrume Bovino (2)	50	80:20% (2)	25
Estrume Bovino (3)	30	80:20% (3)	25

Fonte: Produção do próprio autor.

#### 4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas do afluente e efluente dos reatores foram realizadas na montagem dos reatores e ao término de cada fase experimental. Foi utilizado como parâmetros de análise: pH (método 4500 -H+ B), DQO (método 5220 D) e série de sólidos (método de densidade) de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Apha, 2012). A determinação de alcalinidade e ácidos voláteis foi realizada pelo método titulométrico 2320B proposto por DiLallo e Albertson (1961) e modificado por RIPLEY *et al.*, 1986.

O volume de biogás foi quantificado diariamente nos primeiros dias do experimento, e conforme a diminuição da produção de biogás, as medições foi ocorrendo uma vez por semana

e no final dessa etapa, as medições foram realizadas a cada quinze dias. As medições utilizaram uma seringa da marca Hamilton de 500 ml. A composição de biogás foi analisada por cromatografia gasosa no equipamento CONSTRUMAQ modelo U-14, equipado com coluna Hayesep D. e detector de filamento de tungstênio. O gás de arraste usado foi o hidrogênio ( $H_2$ ) a um fluxo de  $40 \text{ mlmin}^{-1}$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DOS SISTEMAS DE MONO E CO-DIGESTÃO

A caracterização dos substratos vinhaça e estrume bovino, assim como o inóculo se deu por meio da análise de sólidos totais, voláteis e fixos, realizada previamente aos ensaios de potencial bioquímico de metano (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização dos substratos em relação a fração de sólidos

<b>Amostra</b>	<b>Sólidos totais (g/l)</b>	<b>Sólidos totais voláteis (g/l)</b>	<b>Sólidos totais fixos (g/l)</b>	<b>Sólidos voláteis / Sólidos totais (%)</b>
Vinhaça	40,9±0,7	27,6±0,6	13,3±1,3	67,6
Estrume	16,1±1,1	13,9±1,0	3,3±0,1	79,0
Inóculo	13,4±3,3	10,1±3,0	3,2±0,3	76,0

Fonte: Produção do próprio autor.

A vinhaça foi o substrato que apresentou o maior conteúdo de sólidos, tendo o teor de sólidos totais voláteis perante a fração de sólidos totais com estimativa de 67%. No caso do estrume bovino, apesar do menor conteúdo de sólidos voláteis totais, a relação entre sólidos voláteis perante ao sólidos totais foi estimado em 79%, indicando que no caso do estrume bovino existe maior disponibilidade de matéria orgânica disponível para a conversão em biogás. O inóculo apresentou o menor conteúdo de sólidos totais e voláteis comparando aos substratos analisados e sua relação de sólidos foi estimada em 76%. A determinação da série de sólidos do inóculo é essencial para a montagem experimental dos ensaios de potencial bioquímico de metano, visto que na metodologia escolhida para este trabalho, os sistemas de digestão anaeróbia são operados em uma relação de 2:1 em termos de sólidos totais voláteis do inóculo e o substrato ou substratos.

Os sistemas de mono e de co-digestão da fase I foram inicialmente caracterizados em função do pH, DQO e alcalinidades conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização dos sistemas de mono- e co-digestão no início da fase I

Condição Experimental	pH	DQO ( $gO_2l^{-1}$ )	Alcalinidade parcial ( $mgCaCO_3l^{-1}$ )	Alcalinidade intermediária ( $mgCaCO_3l^{-1}$ )	Alcalinidade e intermediária / parcial (AI/AP)
Controle negativo	-	-	-	-	-
Controle positivo	7,9	33,2±2,2	1145±92	370±29	0,32
Vinhaça	7,6	20,5±1,9	1347±108	542±43	0,40
Estrume	7,9	34,6±7,4	1352±108	551±44	0,40
Vinhaça+estrume(98:2%)	8,3	23,6±1,8	1350±108	591±47	0,43
Vinhaça+estrume (95:5%)	7,6	34,0±2,3	1360±109	432±35	0,31
Vinhaça+estrume(90:10%)	7,3	25,7±2,8	968±77	812±65	0,83
Vinhaça+estrume(80:20%)	7,2	33,0±8,7	1245±99	641±51	0,51

Fonte: Produção do próprio autor.

O controle negativo não foi determinado o pH, DQO e alcalinidade inicialmente devido à dificuldade imposta para realização de tais testes, visto que o controle negativo é composto predominantemente por inóculo que possui uma característica mista de líquido e sólido, densa e não uniforme, dificultando a coleta homogênea de forma repetitiva da fração de mistura para análise, desta forma gerando resultados bem variados e impreciso.

O pH de todos sistemas não teve grandes variações, sendo o sistema de co-digestão 98:2 que apresentou o maior pH entre os reatores 8,3, o sistema de co-digestão 80:20 apresentou o menor pH de 7,2. Em relação a alcalinidade parcial e intermediária, o sistema de co-digestão 90:10 seguido da co-digestão 80:20 foram que apresentaram o maior valor na relação de alcalinidade intermediária com a parcial (AI/AP). Relações AI/AP superiores a 0,3 são indesejáveis ao processo, pois indicam a ocorrência de distúrbios no processo de digestão anaeróbia (Duda, 2010). Os demais sistemas avaliados resultaram em valores entre 0,3 e 0,4 de AI/AP, mantendo um sistema de equilíbrio favorável a produção de biogás. O valor ideal da relação entre os ácidos orgânicos voláteis (AI) e à alcalinidade (AP) é entre 0,3-0,4, o que indica uma faixa ótima para produção de biogás (Kunz *et al.*, 2019). A alcalinidade parcial deve-se a presença de sais de ácidos fracos, como bicarbonato, fosfato e borato, sendo a mais relevante na manutenção do pH neutro em sistemas anaeróbios, pois indica a quantidade de ácidos voláteis no processo.

Em relação ao conteúdo de matéria orgânica, avaliado em termos de DQO, observou-se incremento dos valores em relação a vinhaça, quando o estrume foi adicionado aos sistemas de co-digestão. Entretanto, não foi possível correlacionar o valor de DQO com o percentual de

estrupe adicionado, visto que esse comportamento resulta principalmente da dificuldade em homogeneizar o estrupe, em função da sua composição diversa e que inclui a presença de resíduos alimentares de forma líquida ou sólida, não homogêneas.

Comparando-se os resultados iniciais de cada sistema e os resultados observados ao término da Fase III (Tabela 6), nota-se que todos os sistemas apresentaram pequena queda do valor de pH, a exceção do sistema 98:2 que, como será visto adiante, apresentou um comportamento bastante distinto do demais, em todos os parâmetros observados ao longo das três fases experimentais.

Em termos de alcalinidade, houve incremento dos valores tanto para a alcalinidade parcial quanto a intermediária. Em sistemas anaeróbios operados sob estabilidade, espera-se aumento da produção de alcalinidade parcial, considerando que o bicarbonato é um dos produtos resultados da metanogênese acetoclástica (Madingan *et al.*, 2016). Todavia, para os sistemas analisados houve grande incremento da alcalinidade intermediária, resultante do acúmulo de ácidos orgânicos intermediários e que, em sistema contínuos, indicam instabilidade operacional e risco de abaixamento de pH (Elaiuy, 2016). Esse comportamento não foi observado nos sistemas analisados, porém, destaca-se que a cada nova fase operacional para adaptação do inóculo, o pH inicial foi corrigido para próximo da neutralidade (entre 6,5 e 8,0).

Tabela 6 - Caracterização dos sistemas de mono- e co-digestão no final da fase III

<b>Condição Experimental</b>	<b>pH</b>	<b>Alcalinidade parcial (<math>mgCaCO_3l^{-1}</math>)</b>	<b>Alcalinidade intermediária (<math>mgCaCO_3l^{-1}</math>)</b>	<b>Alcalinidade intermediária / parcial (AI/AP)</b>
Controle negativo	-.	215±8	298±16	1,30
Controle positivo	6,2	259±52	396±28	1,52
Vinhaça	7,6	3049±43	4094±50	1,34
Estrupe	7,6	2674±32	2914±50	1,08
Vinhaça+Estrupe(98:2%)	-	-	1191±92	-
Vinhaça+Estrupe(95:5%)	7,4	2875±137	3370±130	1,21
Vinhaça+Estrupe(90:10%)	7,5	2781±322	3504±81	1,25
Vinhaça+Estrupe(80:20%)	7,6	2752±92	3124±81	1,13

Fonte: Produção do próprio autor.

Ao término da fase III os valores de AI/AP ficaram muito acima do ideal, confirmando o desequilíbrio que afetou a produção de biogás como será abordado no tópico seguinte.

## 5.2 PRODUÇÃO DE BIOGÁS DAS FASES I, II E III

Os ensaios de potencial bioquímico de metano tiveram duração total de 14 meses, sendo que a fase I teve 206 dias de operação, seguidos da fase II com 154 dias e a fase III com 74

dias. A Tabela 7 apresenta o volume acumulado de biogás, bem como o pH inicial e final de cada condição experimental dessas fases.

Tabela 7 - Volume total acumulado de biogás e pH inicial e final de cada fase experimental

Condição Experimental	Fase I			Fase II			Fase III		
	Volume Acumulado do Biogás (ml)	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	Volume Acumulado do Biogás (ml)	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	Volume Acumulado do Biogás (ml)	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>
Controle negativo	201±30	-	-	-	-	-	-	-	n.d.
Controle positivo	1125±112	7,9	7,9	1528±246	7,6	7,8	307±206	7,3	6,2
Vinhaça	1099±216	7,6	7,6	1555±97	7,4	7,8	580±309	7,8	7,6
Estrume	1275±26	7,9	7,6	1745±178	7,7	7,7	1192±94	7,4	7,6
Vinhaça+Estrume (98:2%)	473±44	8,3	7,4	-	-	-	-	-	-
Vinhaça+Estrume (95:5%)	879±29	7,6	7,6	1695±28	7,3	7,8	998±120	7,5	7,4
Vinhaça+Estrume(90:10%)	1223±43	7,3	7,7	1978±88	7,3	7,7	493±205	7,5	7,5
Vinhaça+Estrume(80:20%)	1043±47	7,2	7,7	2486±121	7,5	7,6	1268±151	7,7	7,6

Fonte: Produção do próprio autor.

A fase I teve uma operação dos sistemas de mono- ou co-digestão que apresentou discreta variação nos valores de pH inicial e final, indicando manutenção das condições de neutralidade pela presença de substâncias alcalinizantes. O sistema de co-digestão 98:2% foi o único onde se observou maior variação do pH final, entretanto, essa montagem experimental foi iniciada com um pH acima dos demais sistemas e acredita-se que, ao longo da operação, houve consumo da alcalinidade excedente pela produção de ácidos intermediários inerente ao sistema de digestão anaeróbia. Destaca-se também que essa montagem experimental foi a que produziu menor volume acumulado de biogás ao final da fase I, o que pode indicar que não se obteve condições ideais de estabelecimento da metanogênese para esse sistema.

A operação dos sistemas de mono- ou co-digestão na fase II continuou a apresentar discreta variação de pH inicial e final, confirmando a manutenção das condições de neutralidades pela presença de substâncias alcalinizantes, assim como apresentando na fase I. O sistema de co-digestão 98:2% não produziu biogás, indicando o ambiente desfavorável para as metanogênese, cenário já apresentada na fase I. Esse mau funcionamento possivelmente se deu através de um ambiente mais básico no início da fase I, se agravando ao realizar a centrifugação no final da fase I e fase II, visto que foi separado um volume sólido muito baixo de inoculo (biomassa) como apresentado nas tabelas 2 e 3 e, juntamente com esses fatores a

centrifugação pode ter promovido uma areação na biomassa que pode ter prejudicado de forma direta a adaptação do consorcio microbiano a nova carga de mistura de substrato aplicado.

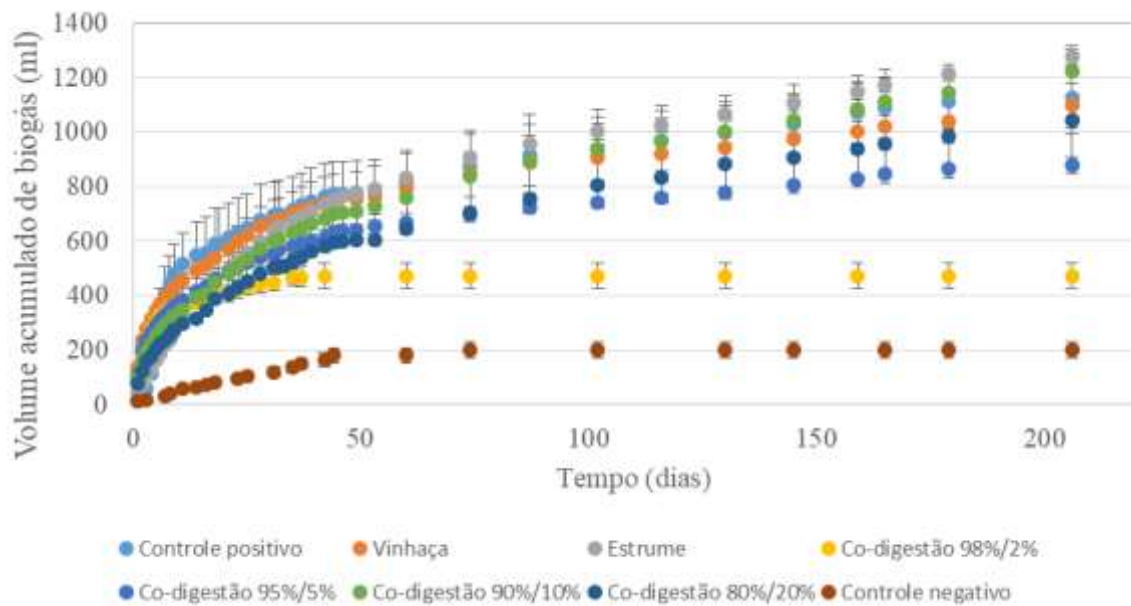
O volume acumulado de biogás em todos sistemas de mono- ou co-digestão foi superior ao volume acumulado apresentado na primeira fase, mesmo com o menor tempo de operação na fase II em relação a fase I. Destaca-se o sistema de co-digestão 95:5% que apresentou uma maior variação de pH entre os sistemas na fase II, superando a produção dos sistemas de mono-digestão de vinhaça e ficando bem próximo a produção de mono-digestão de estrume bovino. O sistema de co-digestão 80:20% demonstrou um bom desempenho na produção de biogás, sendo o sistema que mais produziu biogás na fase II, superando todos sistemas de mono- ou co-digestão. Em relação a fase I, observou um aumento percentual de 36% para o controle positivo, de 41% para o sistema de mono-digestão de vinhaça, 37% para o sistema de mono-digestão de estrume, 95% para o sistema de co-digestão 95:5, 62% para o sistema 90:10 e 138% para o sistema 80:20.

Em relação a fase II, observou-se maior atividade metanogênica, o que pode indicar adaptação e enriquecimento do inóculo, considerando a estratégia adotada de repetir a mesma condição operacional sem alterar o inóculo inicial. Para os sistemas em co-digestão, a estratégia de adaptação e enriquecimento foi mais eficiente do que para os sistemas em mono-digestão. Sistemas em co-digestão apresentam maior diversidade nutricional e, nesse caso, podem ter contribuído para o estabelecimento de condições mais favoráveis à metanogênese do que sistemas de mono-digestão (Hagos *et al.*, 2017; Volpi *et al.*, 2023)

A fase III foi a etapa experimental mais curta em relação ao tempo de operação e apresentou maior instabilidade comparada as fases I e II. A fase III apresentou rápida estabilização da produção de biogás e a variação de pH também se apresentou discreta. O volume acumulado de biogás na fase III foi o mais baixo dentre as 3 fases e retornou para valores próximos a fase I, a exceção da vinhaça e do sistema 90:10, que apresentaram queda expressiva na produção de biogás a valores inferiores a fase I: 47% inferior no caso da vinhaça e 60% inferior para o sistema 90:10.

A produção de biogás foi acompanhada diariamente nas primeiras semanas, conforme o volume produzido foi diminuído o acompanhamento começou a ser a cada 2 dias e por final 1 vez por semana. A média do volume de biogás produzido ao longo da operação da fase I para cada um dos sistemas de mono- e co-digestão pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4 - Volume acumulado de biogás durante a operação da fase I



Fonte: Produção do próprio autor.

Todos os sistemas de mono- e co-digestão não apresentaram uma fase lag significativa, com um volume de biogás acumulado superior a 100 ml após 5 dias de operação. O sistema denominado controle negativo apresentou menor velocidade de produção de biogás, indicando a presença de uma possível fase lag e um tempo de 40 dias para superar o volume de 200 ml acumulado, estabilizando a produção de biogás. O controle negativo é uma condição operacional que tem por objetivo quantificar a produção endógena de biogás, visto que não há adição de fonte de carbono e/ou energia, apenas adição do inóculo utilizado para as demais condições experimentais (Freitas *et al.*, 2023). Dessa forma, espera-se observar uma baixa produção de biogás ao longo de toda a operação. O volume acumulado de biogás no sistema controle negativo foi de 201 ml.

O sistema de mono-digestão contendo estrume bovino como único substrato resultou em maior produção total de biogás ( $1275 \pm 26$  ml), superando o sistema contendo apenas vinhaça que resultou em um volume final de  $1099 \pm 216$  ml e demais combinações dos sistemas de co-digestão. Entretanto, considerando o desvio-padrão com barra de erro das medidas experimentais, observa-se que não existe variação significativa para o volume total acumulado de biogás entre os sistemas contendo estrume bovino em mono-digestão, vinhaça em mono-digestão, controle positivo e a combinação em co-digestão 90:10%.

Os sistemas contendo celulose (controle positivo) e contendo vinhaça apresentam rápido acúmulo de biogás logo no início da operação, porém estabilizam a velocidade de produção

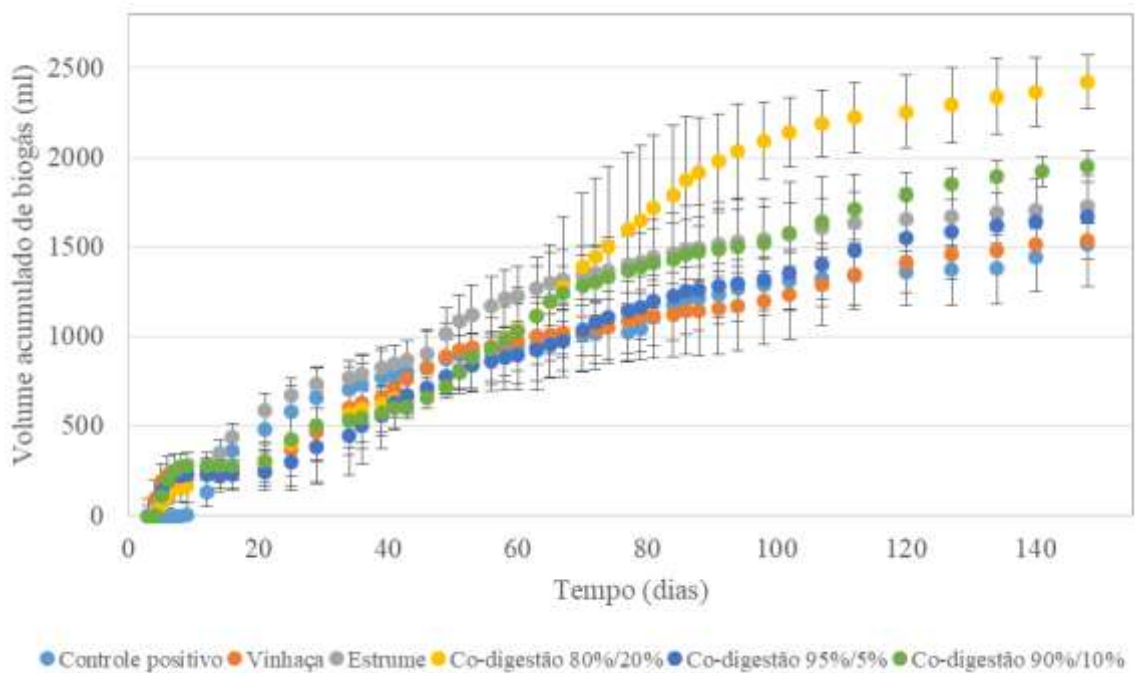
após cerca de 60 dias. No caso do sistema de mono-digestão contendo estrume bovino observa-se uma velocidade mais lenta de produção de biogás, porém esta produção se mantém constante ao longo de todo o período operacional. Esta resposta mais lenta para o estrume bovino como substrato único deve-se, principalmente, à maior presença de matéria orgânica celulósica (capim) que requer a presença da etapa de hidrólise previamente à produção de ácidos orgânicos (Santánnia, 2010). Essa condição não se faz necessária no caso da vinhaça, onde a maior parte do conteúdo orgânico é de fácil degradação (Fuess *et al.*, 2018). No caso do estrume bovino, a caracterização indicou maior potencial de biodegradabilidade, o que reforça o alto conteúdo de biogás observado para esse sistema.

O sistema de co-digestão 98:2% apresentou o menor volume acumulado de biogás ao longo do tempo de operação, com apenas  $473 \pm 44$  ml, comprovando que foi o sistema que obteve maiores dificuldades na adaptação do consórcio microbiano, seja pelo meio mais básico inicial, seja pelo baixo volume de biomassa inoculada nas fases seguintes. Os sistemas de co-digestão contendo 95:5%, 90:10% e 80:20% resultaram em um volume final acumulado de biogás de  $879 \pm 29$ ,  $1223 \pm 43$  e  $1043 \pm 47$ ml, respectivamente.

Os sistemas que apresentaram diferenças na produção de biogás foram os sistemas de co-digestão 80:20%, 95:5% e 98:2%. Para todos esses, a produção de biogás foi inferior aos sistemas de mono-digestão ou à composição 90:10%. De forma, geral, a presença de estrume bovino parece ter influenciado negativamente a produção de biogás quando se avalia a vinhaça isoladamente, visto que essa é o substrato principal de interesse. Entretanto, para o sistema 90:10%, a resposta da co-digestão bem semelhante ao sistema de mono-digestão de vinhaça.

A fase II apresentou uma produção de biogás com um volume maior comparada com a fase I, sendo acompanhada diariamente a produção e a média do volume de biogás produzido ao longo da operação da fase II (Figura 5).

Figura 5 - Volume acumulado de biogás durante a operação da fase II



Fonte: Produção do próprio autor.

Os sistemas de controle negativo e a co-digestão 98:2% não produziram biogás, indicando um possível esgotamento da comunidade metanogênica, visto que obtiveram baixos volume de biomassa inoculante e conseqüentemente de biogás acumulado na fase anterior.

O controle positivo apresentou uma fase lag mais significativa, sendo que os demais sistemas não apresentaram fase lag significativa, ultrapassando os 100 ml de volume acumulado nos primeiros 5 dias. Todos sistemas tiveram um volume acumulado de biogás superior a 500 ml após 40 dias.

Na fase II os sistemas de co-digestão 80:20% e 90:10% apresentaram um volume acumulado de biogás superior aos sistemas de mono-digestão, respectivamente de  $2486 \pm 121$  ml e  $1978 \pm 88$  ml. Ao longo de 60 dias, a produção de biogás dos sistemas de co-digestão e de mono-digestão apresenta um volume acumulado de biogás próximos, considerando o desvio-padrão das medidas experimentais.

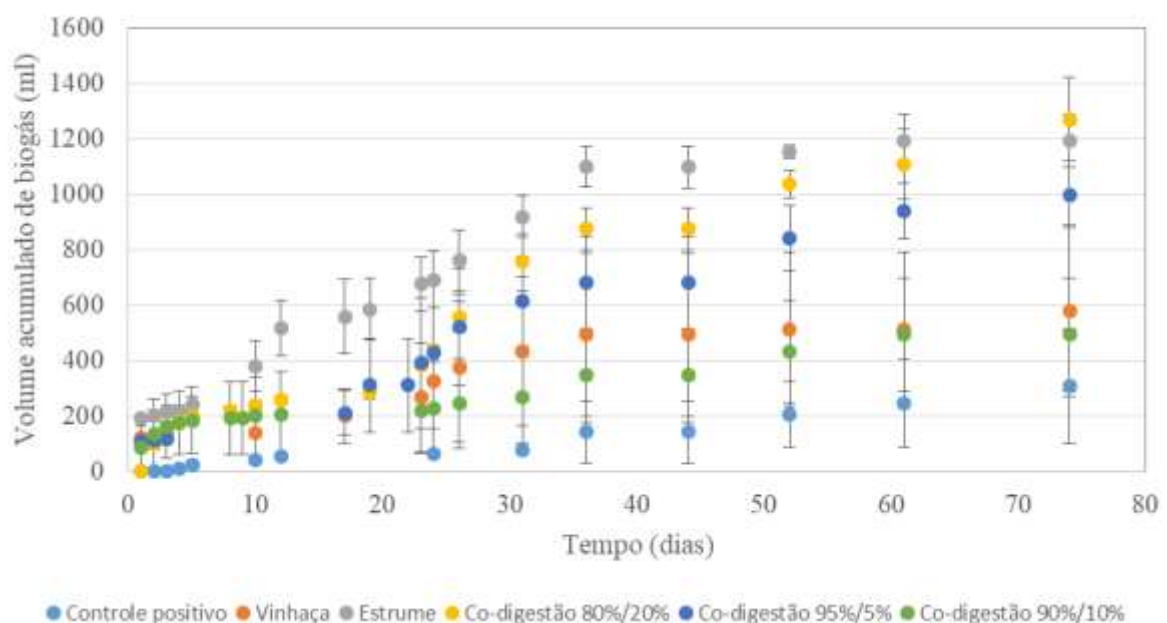
A fase II apresenta uma característica importante para os sistemas de mono-digestão a partir do 60º dia, com diminuição no volume de biogás produzido para o sistema contendo apenas estrume e, diferentemente, o sistema contendo vinhaça resultou em uma produção mais lenta, porém constante ao longo da fase II. A produção mais rápida do sistema de estrume pode ser um indicativo da consolidação da fase de hidrólise e a produção prévia de ácidos orgânicos presente na fase I. Na fase II, o sistema de estrume apresentou melhor biodegradabilidade e,

consequentemente, resultou em maior volume de matéria orgânica disponível para conversão em biogás. O sistema mono-digestão de vinhaça, por sua vez, operou com uma velocidade mais lenta ao longo da fase II, com produção contínua de biogás.

Os sistemas de co-digestão 90:10% e 80:20% a partir do 60º dia apresentaram alta significativa na produção de biogás, gerando um volume acumulado bem superior aos sistemas de mono-digestão. O sistema de co-digestão 95:5% operou de forma lenta e contínua, assim como o sistema mono-digestão de vinhaça. A fase II demonstrou uma pequena vantagem para os sistemas de co-digestão comparados aos sistemas de mono-digestão para a produção acumulada de biogás, indicando uma adaptação melhor do inóculo ao sistema de substratos contendo vinhaça e estrume.

A fase III apresentou uma produção de biogás instável, com menor tempo de operação comparado a fase I e a fase II. O volume acumulado de biogás em alguns sistemas apresentou volumes semelhantes ao volume acumulado na fase I, e em outros sistemas o volume acumulado foi bem abaixo as produzidas na fase I e na fase II. A produção foi acompanhada diariamente, assim como a média do volume acumulado (Figura 6).

Figura 6 - Volume acumulado de biogás durante a operação da fase III



Fonte: Produção do próprio autor.

O controle positivo na fase III apresentou uma fase lag maior, levando mais de 50 dias para superar o volume de 200 ml. O volume acumulado final foi de  $307 \pm 206$  ml. Semelhante a fase I, os sistemas de mono e co-digestão não tiveram grandes diferenças, considerando

desvio-padrão como barra de erro das medidas experimentais, não foi observado variação considerando o desvio padrão para o volume total acumulado de biogás entre os sistemas contendo estrume em mono-digestão e o sistema de co-digestão 80:20%.

O sistema de co-digestão 90:10% e o sistema de mono-digestão de vinhaça apresentaram maior lentidão em termos de produção de biogás, sendo que o sistema de mono-digestão de vinhaça superou o volume de 200 ml próximo ao 20º dia, resultando em uma produção total bem inferior às fases I e fase II. O mesmo ocorre com a co-digestão 90:10%, entretanto esse sistema não apresentou uma fase lag significativa, conseguindo superar os 200 ml nos 5 primeiros dias. A co-digestão 95:5% no 20º dia tem uma produção significativa no volume de biogás, semelhante a obtida dos sistemas 80:20% e 90:10% na fase II.

A alta de volume do biogás acumulado do sistema 80:20% ocorre de forma mais gradual na fase III, e se mostra novamente com bom desempenho em sua operação para produção do biogás, tendo o maior volume acumulado de biogás entre todos sistemas nessa fase operacional ( $1268 \pm 151$  ml). A mono-digestão de estrume não teve uma fase lag significativa, superando os 200 ml em menos de 5 dias. Assim como nas fases I e II, resultou em um volume acumulado de biogás de  $1192 \pm 94$  ml.

Na fase III não foi evidenciada nenhuma vantagem dos sistemas de co-digestão sobre os sistemas de mono-digestão, porém observou-se um esgotamento na atividade metanogênica no sistema contendo vinhaça, assim como no sistema de co-digestão 90:10%. Os sistemas de co-digestão 95:5%, 80:20% e o sistema mono-digestão de estrume indicaram melhor adaptação que os demais, porém também apresentaram redução na atividade produtora de biogás.

### 5.3 PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE METANO

A produção de metano ao longo do experimento foi calculada de forma específica em relação ao conteúdo de sólidos voláteis do reator (Tabela 8), visto a premissa adotada VDI4630. Assim como a produção de biogás, a produção de metano teve seu melhor desempenho na fase II, seguindo da fase I e com menor produção de metano na fase III. Tabela 8. Produção específica de metano nas fases I, II e III.

Tabela 8 - Produção específica de metano nas fases I, II e III

Condição Experimental	Fase I	Fase II	Fase III
	Produção específica (ml NCH <sub>4</sub> / gSTV)		
Controle positivo	858±85	977±157	88±9
Vinhaça	1034±204	1193±74	199±4
Estrume	1136±24	1413±142	679±77
Vinhaça + estrume (98:2%)	420±39	-	-
Vinhaça + estrume (95:5%)	937±30	1885±32	811±86
Vinhaça + estrume (90:10%)	1327±50	2100±93	70±8
Vinhaça + estrume (80:20%)	968±44	1986±97	973±86

Fonte: Produção do próprio autor.

A produção específica de metano foi maior para todos os sistemas analisados na Fase II, em comparação as Fases I e III. No caso do sistema 98:2, não foi detectada produção de biogás nas Fases II e III e, portanto, não houve produção de metano. Na Fase I, não se observou diferença significativa no volume acumulado de metano entre os frascos em operação, quando se considera o desvio padrão entre as triplicatas, exceto para o sistema 98:2, que desde o início apresentou baixa produtividade em relação ao biogás e, conseqüentemente, em relação a produção específica de metano. Sistemas de mono e co-digestão de vinhaça foram avaliados por (Volpi *et al.*, 2021) e indicaram que a adição de substratos coadjuvantes (torta de filtro e licor de desacetilação) contribuíram de forma positiva para a produção específica de metano, que aumento de 507 para 871 mlNCH<sub>4</sub>/g SVT. Destaca-se o sistema 90:10, que em termos de metano, foi aquele que apresentou maior produção específica. Essa diferença não foi observada quando se analisa apenas o volume de biogás acumulado, visto que o sistema 90:10 e o sistema de mono-digestão de estrume bovino apresentaram valores acumulados de biogás muito próximos. Nesse sentido, é provável que no sistema 90:10 a produção de metano foi favorecida, em detrimento da produção de gás carbônico.

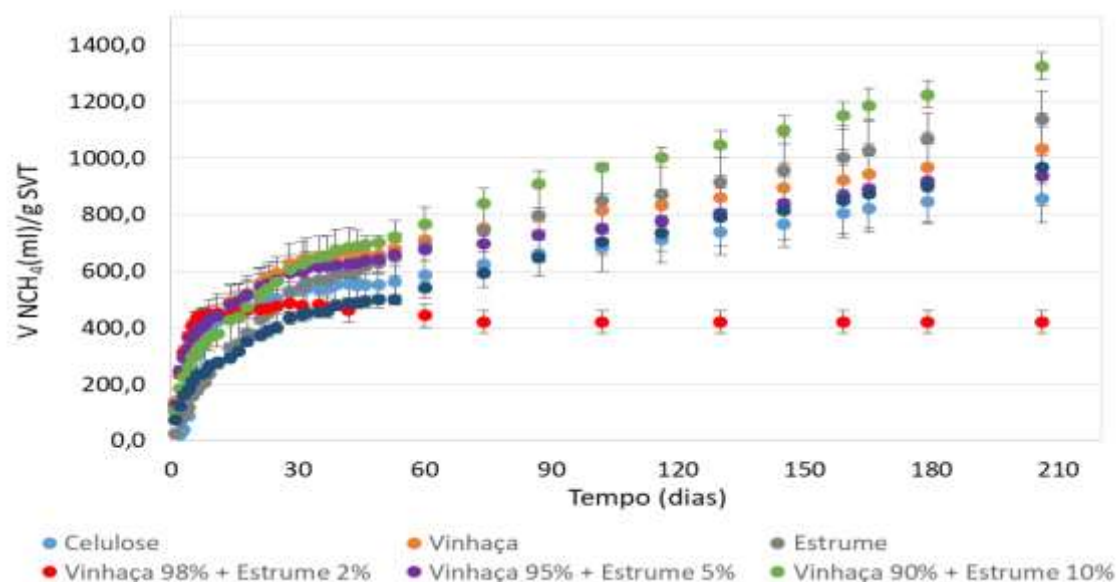
Na fase II, observou-se aumento na produção específica, tanto para os sistemas em mono-digestão, quando co-digestão, assim como observado para o biogás acumulado, que apresentou expressivo aumento na fase II. Em relação a fase I, o aumento observado foi de 14% para o controle positivo, 15% para o sistema de mono-digestão de vinhaça, 24% para o sistema de mono-digestão de estrume bovino, 100% para o sistema de co-digestão 95:5, 58% para o sistema de co-digestão 90:10 e 100% para o sistema de co-digestão 80:20. Percebe-se que os sistemas tanto de mono-digestão, mas, especialmente, os sistemas de co-digestão indicaram

adaptação do inóculo entre a fase I e a fase II, com maiores volume acumulado de biogás e maior produção específica de metano.

Na fase III, a produção específica de metano apresentou grande redução para a maioria dos sistemas de digestão anaeróbia, com queda significativa em relação a fase I, 90% para o controle positivo, 90% para o sistema de mono-digestão de vinhaça, 40% para o sistema de mono-digestão de estrume, 15% para o sistema de co-digestão 95:5 e 95% para o sistema de co-digestão 90:10. O sistema de co-digestão 80:20 manteve-se estável em relação a fase I. Como a fase III foi uma fase de operação curta, não foi possível inferir se, de fato, chegou-se a um esgotamento do inóculo devido à dificuldade de adaptação do consórcio microbiano após a centrifugação no final da fase II, ou se uma fase lag maior seria observada, visto a queda brusca no volume produzido de metano, comparando o mesmo período de dias das fases I e II.

Em termos de fase lag, observou-se que na fase I (Fig. 7), os sistemas tanto de mono-, quanto de co-digestão, apresentaram uma rápida resposta em termos de produção específica de metano. Após 75 dias, todos os sistemas haviam ultrapassado a produção de 600 mlNCH<sub>4</sub>/g SVT. Em adição, não foi possível observar a estabilização da produção específica de metano, como foi observado para o volume acumulado de biogás, a exceção do sistema de co-digestão 98:2.

Figura 7 - Produção específica de metano na fase I

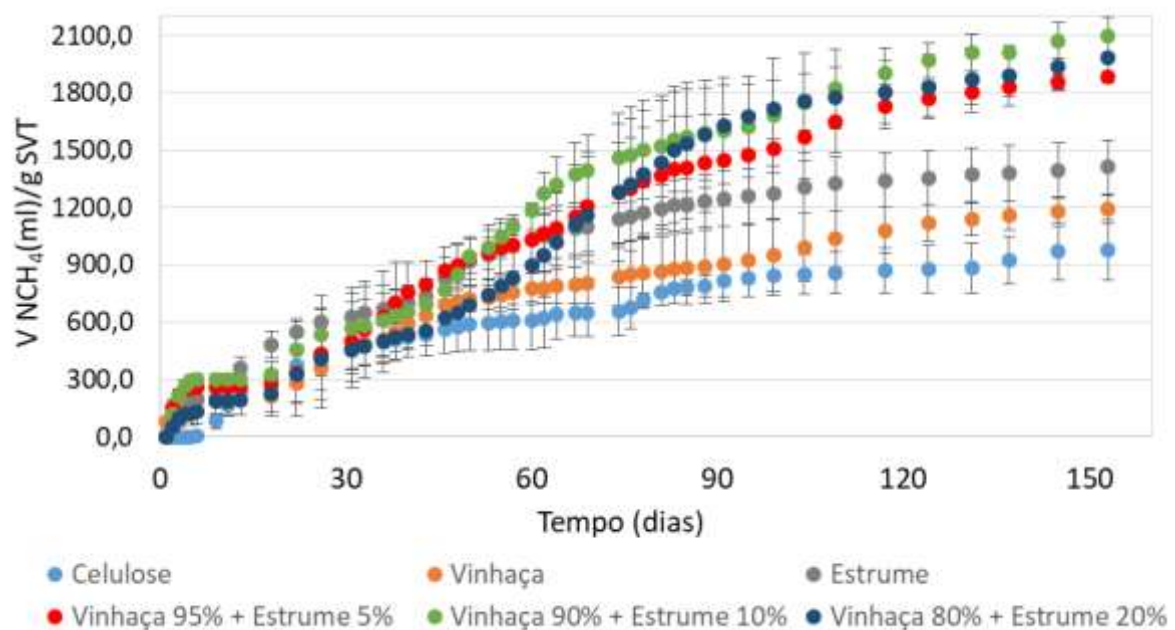


Fonte: Produção do próprio autor.

Já na fase II (Fig. 8), após 45 dias, todos os sistemas de mono- e co-digestão ultrapassaram os 600 mlNCH<sub>4</sub>/g SVT, indicando uma resposta mais rápida, em termos cinéticos, para a

produção específica de metano e, conseqüentemente, maior adaptação do inóculo às condições experimentais. Os sistemas de co-digestão não apresentaram estabilização na produção específica de metano, porém os sistemas em mono-digestão de vinhaça, estrume e o controle positivo estabilizaram a produção específica de metano após 117 dias de operação. O controle positivo foi o único sistema onde se observou uma fase lag de 10 dias, porém, superado esse momento, apresentou rápida resposta à produção de metano.

Figura 8 - Produção específica de metano na fase II



Fonte: Produção do próprio autor.

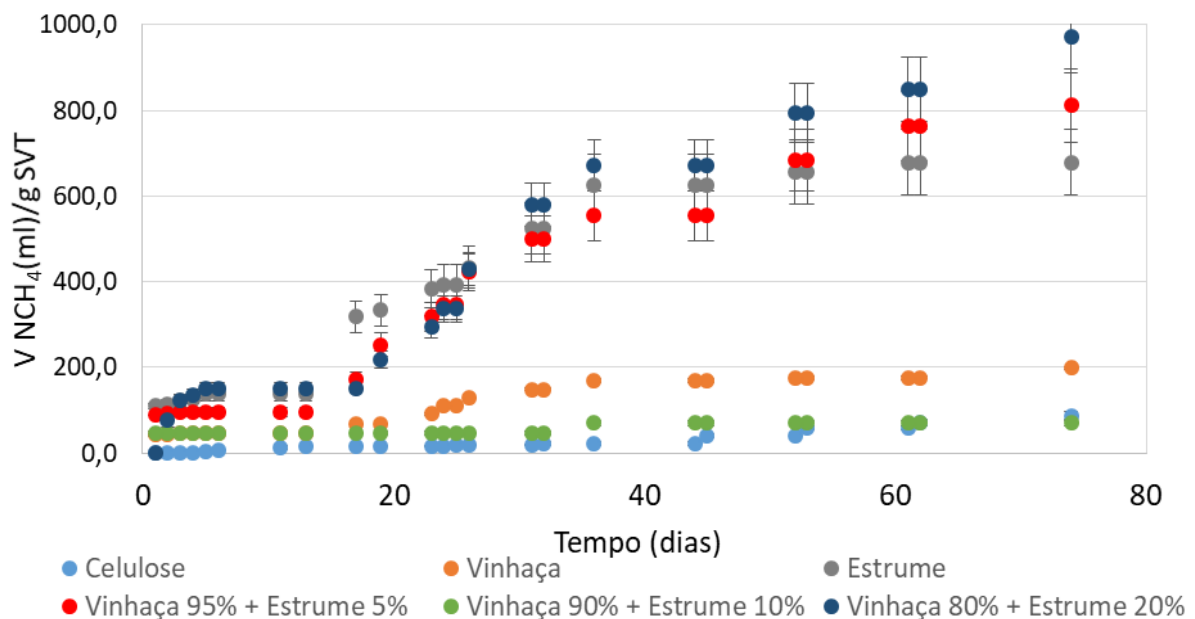
Considerando a variação no desvio-padrão das triplicatas, na fase II os sistemas de co-digestão apresentaram diferença significativa em relação aos sistemas de mono-digestão, indicando a existência de benefício metabólico para a produção de metano que se utiliza mais de um substrato. Avaliando os valores de AI/AP no início do experimento da fase I, observa-se um sistema estável para produção de metano em quase todas condições experimentais analisadas, exceto as co-digestões 90:10, 80:20, que apresentaram valores de AI/AP de instabilidade, entretanto seu rendimento na produção no volume de metano e a manutenção de seus pH demonstram que conseguiram encontrar uma estabilidade dentro do reator, provavelmente devido a redundância microbiana presente na combinação dos substratos. O sistema de mono digestão de vinhaça produziu menor quantidade de metano em termos de sólidos voláteis totais do que o sistema de mono-digestão de estrume, indicando que é a adição

de estrume ao sistema de co-digestão resultou em produção mais significativa de biogás e metano.

Na fase III, observou-se uma redução significativa na produção específica de metano em relação a fase II, indicando que a comunidade metanogênica não foi capaz de responder de forma rápida como nas fases anteriores. Destaca-se o tempo reduzido dessa fase, que precisou ser encerrada em função do término deste projeto. Para os sistemas em co-digestão 95:5 e 80:20 e o sistema em mono-digestão de estrume, as curvas de produção específica de metano ainda apresentavam uma inclinação positiva quando os sistemas foram interrompidos, indicando que poderia se estabelecer uma condição com maior produção de metano da observada até o 74º dia.

Diferentemente das outras fases, a produção de metano não ocorreu rapidamente e os reatores apresentaram uma fase lag bem considerável. Nas primeiras 24 horas após a realização da montagem dos reatores, ocorreu um primeiro momento de produção de metano, entretanto, os reatores apresentaram, em média, 15 dias de fase lag, à exceção dos sistemas de mono digestão de estrume e o sistema 80:20, que logo de início apresentaram rápida produção de metano. Esse comportamento reforça que a presença de estrume melhora a digestão anaeróbia, comparativamente à digestão de vinhaça.

Figura 9 - Produção específica de metano na fase III



Fonte: Produção do próprio autor.

A concentração máxima de metano no biogás também se alterou ao longo das fases de operação dos sistemas de mono- e co-digestão (Tabela 9). Na fase I, o percentual máximo observado de metano em todos os sistemas analisados foi de 65%, não se observando nenhuma influência do tipo de substrato ou sistema de mono- e co-digestão. Em sistemas anaeróbios em operação estacionária, espera-se que o conteúdo de metano esteja próximo de 65% quando as condições nutricionais e ambientais estão próximos dos valores ótimos exigidos pelas arqueias metanogênicas (Elaiuy, 2016).

Na fase II foi possível observar uma queda no valor máximo de metano observado, em especial para o sistema de mono-digestão de vinhaça e o controle positivo. Essa redução foi acentuada na fase III, na qual o conteúdo de metano no biogás não ultrapassou 20%. A presença de estrume nos sistemas de co-digestão foi importante para manter os valores de metano mais elevados, porém na fase III, todos os sistemas apresentam redução no conteúdo de metano. O sistema de co-digestão 95:5 atingiu 40% de concentração de metano no biogás na fase III, enquanto o sistema 80:20 atingiu 45%, sendo os sistemas também que resultaram em maior produção específica de metano. O percentual de metano no biogás é responsável pelo poder calorífico que pode ser convertido em eletricidade, energia térmica ou combustível na forma de biometano (Pompermayer; Paula Junior, 2000).

Tabela 9 - Percentual máximo de metano no biogás nas fases I, II e III

	<b>Fase I</b>	<b>Fase II</b>	<b>Fase III</b>
<b>Condição Experimental</b>	<b>Metano (%)</b>	<b>Metano (%)</b>	<b>Metano (%)</b>
Controle positivo	65,0	45,0	20,0
Vinhaça	65,0	45,0	20,0
Estrume	65,0	50,0	35,0
Vinhaça + estrume (98:2%)	65,0	-	-
Vinhaça + estrume (95:5%)	65,0	55,0	40,0
Vinhaça + estrume (90:10%)	65,0	55,0	20,0
Vinhaça + estrume (80:20%)	65,0	47,0	45,0

Fonte: Produção do próprio autor.

## 6 CONCLUSÃO

O tratamento de efluentes utilizando a digestão anaeróbia visando a produção de biogás e metano demonstra ser uma ótima alternativa para a mitigação dos impactos gerado na emissão de gases de efeito estufa, podendo prover uma solução mais sustentável e rentável para os setores que implementarem esse tipo de tratamento.

Analisando os setores sucroalcooleira e pecuária, que possuem resíduos difíceis para serem degradado, a digestão anaeróbia pode promover um tratamento mais eficiente, e avaliando os seus potenciais energéticos, mostra ser uma ótima alternativa. No cenário atual, os resíduos gerados nesses setores como o estrume bovino e a vinhaça já vem consolidando seu uso como substratos para geração de biogás e metano através da digestão anaeróbia, assim promovendo um tratamento para esses efluentes mais sustentável.

Com a caracterização dos substratos e o inóculo fica evidenciado que os três elementos presente na montagem do reator possuem um potencial de degradação, em especial o estrume bovino que oferece mais matéria orgânica ao sistema de digestão anaeróbia, conseqüentemente favorecendo o consorcio microbiano presente na biomassa inoculada.

Em relação a produção de biogás, a fase I conseguiu manter um nível de produção em mais tempo, entretanto, não ficou evidenciado uma diferença notória entre as mono- digestões com as co-digestões, porém vale ressaltar que nessa primeira fase os reatores que operaram com fração maiores de estrume na co-digestão conseguiram ter um desempenho equiparável as monos digestões de vinhaça e estrume bovino. Com a realização da centrifugação para montagem da fase II, a adaptação e enriquecimento da biomassa foi bem positiva, visto que todos reatores operaram com menos tempo e foram capaz de produzir praticamente o dobro de volume do biogás, com exceção a mistura 98:2%, que desde a primeira fase obteve dificuldades para a produção de biogás. Mas ao realizar o mesmo procedimento para fase III, observou um grande distúrbio no processo metabólico do sistema, visto que todas misturas demoraram muito mais para começar a produzir biogás, e na grande maioria apontou um esgotamento das atividades das arqueias metanogênicas, exceto a mistura 80:20%, que ainda conseguiu manter um padrão de produção próximo a fase I.

Pensando em relação a produção de metano, a fase I já demonstrou diferenças em relação a produção de biogás, visto que a co-digestão 90:10% conseguiu produzir mais metanos que todas as outras co-digestões e mono-digestões. A fase II e a fase III já seguiram os padrões de produção de biogás, entretanto, houve uma diminuição no percentual de metano produzido em relação a fase I, II e a III, saindo da faixa dos 65% na fase I para 20% a 45% na fase III.

Como discutido, a relação entre a alcalinidade intermediária e a parcial na fase I conseguiu promover um meio favorável para digestão anaeróbia para produzir biogás e metano. Já na fase final III, essa relação demonstrou valores que apontaram a presença de distúrbio no meio, fato comprovado também pela produção irregular e baixa de biogás e metano.

Por fim, ao analisarmos as vantagens e desvantagens da co-digestões em relação as mono-digestões, apesar da fase I e fase III não demonstrar grandes diferenças, pode concluir que ao longo do experimentos as co-digestões com maior volume de estrume bovino conseguiram ter bons desempenhos, podendo contribuir em muito nos problemas enfrentados nesses setores para produção de biogás e etanol de forma constante ao longo do ano, principalmente ao avaliar a questões de entressafra existente no setor sucroalcooleira. E a utilização de biomassa proveniente de lodo resultante no tratamento de efluentes na indústria aviária, demonstrou boa resposta ao utilizar a mono- e co-digestões.

## REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, E. Comparison of nanoparticles effects on biogas and methane production from anaerobic digestion of cattle dung slurry. **Renewable Energy**, v. 87, p. 592-598, mar. 2016.
- ABDELSALAM, E. Effects of Co and Ni nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of slurry. **Energy Conversion And Management**, v. 141, p. 108-119, jun. 2017.
- ABDELSALAM, E. Influence of zero valent iron nanoparticles and magnetic iron oxide nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of manure. **Energy**, v. 120, p. 842-853, fev. 2017.
- AGUIAR, A. B. S. **Produção de biogás a partir da integração de vinhaça com resíduos da pecuária**. 2016. 142 f. Tese (Doutorado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- ALBANEZ, R. Anaerobic Biological Treatment of Vinasse for Environmental Compliance and Methane Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 21–43, 2016.
- ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. [Título do documento]. 2017. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=345545>. Acesso em: 15 fev. 2022.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, DC: APHA, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DISTRIBUIDORAS DE GÁS CANALIZADO (ABEGÁS). **Quem somos**. Disponível em: <https://www.abegas.org.br/quem-somos>. Acesso em: 15 fev. 2022.
- AZIM, A. A. *et al.* The physiology of trace elements in biological methane production. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 775-786, out. 2017.
- BARALDI, E. A. **Avaliação da comunidade e atividade microbiana em reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP)...** [S. l.: s. n.], 2010. Acesso em: 5 fev. 2022.
- BAYR, S. *et al.* Effect of additives on process stability of mesophilic anaerobic monodigestion of pig slaughterhouse waste. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 106-113, 2012a.
- BAYR, S. *et al.* Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of rendering plant and slaughterhouse wastes. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 28-36, 2012b.
- BRAUN, R. *et al.* Desenvolvimentos recentes na recuperação de bioenergia por fermentação. In: INSAM, H.; FRANKE-WHITTLE, I. H.; GOBEMA, M. (ed.). **Micróbios no trabalho: de resíduos a recursos**. Berlim: Springer, 2010. p. 35-58.

BRIONES, A.; RASKIN, L. Diversidades e dinâmica de comunidades durante o start-up em biorreatores metanogênicos expostos a níveis crescentes na amônia. **Ambiente Tecnol.**, v. 26, p. 85-91, 2003.

CAI, Y. *et al.* Effects of adding trace elements on rice straw anaerobic mono-digestion: Focus on changes in microbial communities using high-throughput sequencing. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 454-463, set. 2017.

CALEGARI, R. P. **Produção de biogás a partir de vinhaça concentrada**. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**: princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 2. ed. Belo Horizonte: Desa/UFMG, 2007. 380 p.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Diversidade procariótica e seus limites: estrutura da comunidade microbiana na natureza e implicações para a ecologia microbiana. **Atual Opinião Microbiol.**, v. 7, p. 221-226, 2004.

D'AQUINO, C. A. **Biogás de vinhaça**: Abiogás: apresentação. 2016. Disponível em: <http://www.agropolocampinasbrasil.org/>. Acesso em: 24 abr. 2022.

DEL NERY, V. *et al.* Granules characteristics in the vertical profile of a full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating poultry slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 102–114, 2008.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 992-998, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.022>. Acesso em: 20 mar. 2022.

DEUTSCHER, V. **VDI 4630**: fermentation of organic materials characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. Alemanha: VDI, 2006.

DMS. **Censo de confinamento dsm registra 6,95 milhões de bois confinados em 2022**. 2022. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

DOLFING, J.; LARTER, S. R.; HEAD, I. M. Restrições termodinâmicas na biodegradação do petróleo bruto metanogênico. **ISME J.**, v. 2, p. 442-452, 2008.

DUDA, R. M. **Desempenho de sistema composto por reatores anaeróbios em série seguido de filtro biológico percolador no tratamento de águas residuárias de suinocultura**. 2010. 241 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

ELAIUY, M. L. C. **Biodigestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar**: abordagem do modelo ADM1 e eficiência de biodegradação no solo. 2016. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

FENG, L. *et al.* Aprimoramento da proteína de lodo ativado por resíduos conversão e acúmulo de ácidos graxos voláteis durante a fermentação anaeróbica de lodo ativado por adição de substrato de carboidratos: o efeito do pH. **Environ. Sci. Technol.**, v. 43, n. 12, p. 4373–4380, 2009.

FLORENTINO, H. O. *et al.* Funções sigmoidais aplicadas na determinação da atividade metanogênica específica – AME. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 141-150, mar. 2010.

FORESTI, E. *et al.* Anaerobic Processes as the Core Technology for Sustainable Domestic Wastewater Treatment: Consolidated Applications, New Trends, Perspectives, and Challenges. **Reviews In Environmental Science And Bio/technology**, v. 5, n. 1, p. 3-19, fev. 2006.

FORESTI, E. *et al.* Fundamentos do tratamento anaeróbio. In: CAMPOS, J. R. (coord.). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 29-52.

FRANKE-WHITTLE, I. H.; GOBERNA, M.; ISAM, H. Projeto e teste do microarray ANAEROCHIP para investigação de comunidades metanogênicas. **J. Microbiol. Métodos**, v. 79, p. 279-288, 2009.

FREITAS, G. P. *et al.* Anaerobic Co-Digestion of Vinasse and Pentose Liquor and the Role of Micronutrients in Methane Production within Sugarcane Biorefineries. **Methane**, v. 2, n. 4, p. 426-439, 2023.

FUESS, L. T. *et al.* Biochemical butyrate production via dark fermentation as an energetically efficient alternative management approach for vinasse in sugarcane biorefineries. **Renewable Energy**, v. 158, p. 3–12, 2020.

FUESS, L. T. *et al.* Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresour Technol**, v. 247, p. 426–433, 2018a.

GOBERNA, M. *et al.* Adaptation of methanogenic communities to the cofermentation of cattle excreta and olive mill wastes at 37° and 55°C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6564-6571, 2010.

GONÇALVES, C. S. **Avaliação do Potencial de Geração de Biogás a partir de Resíduos de Boviniculturas na Área Metropolitana do Porto**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2010.

GUNASEELAN, V. N. Biomass estimates, characteristics, biochemical methane potential, kinetics and energy flow from *Jatropha curcus* on dry lands. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 589-596, 2009.

HAGMAN, L. *et al.* The role of biogas solutions in sustainable biorefineries. **Journal Of Cleaner Production**, v. 155, p. 1-8, mar. 2017.

HAGOS, K. *et al.* Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1485–1496, 2017.

HOLM-NIELSEN, J. B. *et al.* The future of anaerobic digestion and biogas utilization. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5478–5484, 2009.

INSAM, H.; FRANKE-WHITTLE, I. H.; GOBERNA, M. Micróbios no tratamento de resíduos aeróbios e anaeróbios. In: INSAM, H.; FRANKE-WHITTLE, I. H.; GOBERNA, M. (ed.). **Micróbios no trabalho: de resíduos a recursos**. Berlim: Springer, 2010. p. 1-34.

JANKE, L. *et al.* Biogas Production from Sugarcane Waste: Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20685-20703, 31 ago. 2015.

JUNTUPALLY, S. *et al.* Relative evaluation of micronutrients (MN) and its respective nanoparticles (NPs) as additives for the enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 290-295, ago. 2017.

KARRIS, S. R. *et al.* Toxicidade de cobre para atividades acetoclásticas e hidrogenotróficas de metanogênios e redutores de sulfato e lodo anaeróbio. **Quimiosfera**, v. 62, p. 121-127, 2006.

KUNZ, A. *et al.* **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera, 2019.

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 1, p. 3-28, 1995.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganism**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MALINA, J. F.; POHLAND, F. G. **Design of Anaerobic Processes for the Treatment of Industrial and Municipal Wastes**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1992. 214 p.

MATHIAS, J. F. C. M. Manure as a resource: Livestock waste management from anaerobic digestion, opportunities and challenges for Brazil. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 17, n. 4, p. 87–110, 2014.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering treatment Disposal Reuse**. 4. ed. New York: Mcgraw - Hill Book, 2003. 1408 p.

MONTEGGIA, L. O. **The Use of Specific Methanogenic Activity for Controlling Anaerobic Reactors**. 1991. Tese (Doutorado) – University of Newcastle, Newcastle, 1991.

MORAES, B. S. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015.

NUNES, W. A. G. A. *et al.* **Caracterização de Resíduos Orgânicos de Cadeias Produtivas da Agropecuária na Região Centro-Oeste do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2017.

OLIVEIRA, L. L. *et al.* Estudo sobre cogeração de energia elétrica no setor sucroalcooleira. **REGRAD**, v. 10, n. 1, 2017. Disponível em: [https://revista.univem.edu.br/...](https://revista.univem.edu.br/) Acesso em: 3 mar. 2023.

OLIVEIRA, P. A. V. **Manual de manejo e utilização dos dejetos suínos**. Concórdia: Embrapa, 1993. 188 p. (Documentos, 27).

OOSTERKAMP, M. J. *et al.* Identificação de metanogênese e sintrofia como processos metabólicos microbianos importantes para a digestão anaeróbica termofílica ideal de cana-de-energia vinhaça fina. **Biores. Tecnol. Relatórios**, v. 7, 2019.

OTHMAN, I. *et al.* Livestock wastewater treatment using aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 630–634, 2013.

OWEN, W. F. *et al.* Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. **Water Science and Technology**, v. 13, n. 5, p. 485-500, 1979.

PEREIRA, I. Z. *et al.* Uma breve revisão sobre a indústria sucroalcooleira Brasil com enfoque no potencial de geração de energia. **Revista Brasileira de Energia**, v. 25, n. 2, 2019.

PETTA, L. *et al.* Avaliação do tratabilidade de efluentes de uma destilaria de adegas (vinhaça) por UASB, UF-MBR anóxico-aeróbica e precipitação/adsorção química. **J. Environ. Gerenciar**, v. 201, p. 177-180, 2017.

POMPERMAYER, R. S.; PAULA JUNIOR, D. R. Estimativa do potencial brasileiro de produção de biogás através da biodigestão da vinhaça e comparação com outros energéticos. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 3., 2000, Campinas. Campinas: Unicamp, 2000.

PPB. PROGRAMA PRIORITÁRIO DE BIOCOMBUSTÍVEIS. 2012. Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/norma/168817>. Acesso em: 10 jan. 2024.

RAMOS, C. Factors in the determination of methanogenic potential of manure. **Bioresource Technology**, v. 48, n. 2, p. 135-142, 1994.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digester of High-Strength Wastes. **Journal Water pollution, Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

SANT'ANNA, G. L. **Tratamento Biológico de Efluentes: fundamento e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010. 213 p.

SANTOS, G. **Geração de biogás a partir de efluentes de abatedouros**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: [https://www.academia.edu/...](https://www.academia.edu/) Acesso em: 3 fev. 2022.

SANTOS, I. A.; NOGUEIRA, L. A. H. Estudo energético do esterco bovino: seu valor de substituição e impacto da digestão anaeróbia. **Revista Agroambiental**, v. 4, n. 1, abr. 2012.

SILVA, G. A. **Avaliação das tecnologias de disposição de vinhaça de cana de açúcar quanto ao aspecto de desenvolvimento ambiental e econômico**. 2012. Tese (Doutorado em Térmica e Fluidos) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SINHA, P.; PANDEY, A. Um relatório avaliativo e desafios para a produção fermentativa de biohidrogênio. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 13, p. 7460-7478, 2011.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, p. 568–577, 2009.

THAUER, R. K. *et al.* Archea metanogênica: diferença ecologicamente relevantes na conservação de energia. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 579-591, 2008.

VDI 4630 – VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE. **Richtlinien 4630**: a fermentação de materiais orgânicos: caracterização do substrato, amostragem, coleta de dados de materiais e testes de fermentação. Düsseldorf: VDI, 2006.

VOLPI, M. P. C. *et al.* Economic performance of biogas production and use from residues co-digestion in integrated 1G2G sugarcane biorefineries: Better electricity or biomethane? **Energy Conversion and Management**, v. 277, 2023.

VOLPI, M. P. C. *et al.* Use of Lignocellulosic Residue from Second-Generation Ethanol Production to Enhance Methane Production Through Co-digestion. **BioEnergy Research**, v. 15, p. 602–616, 2022.

VON SPERLING, M. *et al.* Overall performance evaluation of shallow maturation ponds in serie treating UASB reactor effluente: Ten years of intensive monitoring of a system in Brazil. **Ecological Engineering**, v. 73, p. 175-185, 2014.

WARE, A.; POWER, N. Modelling methane production kinetics of complex poultry slaughterhouse wastes using sigmoidal growth functions. **Renewable Energy**, v. 104, p. 50-59, 2017.

WOJCIESZAK, M. *et al.* Adaptação de inóculos metanogênicos para digestão anaeróbica de silagem de milho. **Frente. Microbiol.**, v. 8, 2017.

YAMROT, M. A. *et al.* Elucidating microbial community adaptation to anaerobic co-digestion of fats, oils, and grease and food waste. **Water Research**, v. 124, p. 102-112, 2017.

YANG, W. *et al.* Modelagem dinâmica de uma escala real processo de arranque de digestor mesófilo anaeróbio para tratamento de lamas primárias. **J Environ. Química Eng.**, v. 7, n. 3, 2019.

ZAHEDI, S. *et al.* Mudanças na comunidade microbiana durante a produção de hidrogênio e metano no processo de co-digestão anaeróbica termofílica de dois estágios de resíduos biológicos. **Waste Manag.**, v. 49, p. 40–46, 2016.