

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PRISCILLA DE SOUZA ALMEIDA

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR  
DA CO-DIGESTÃO DE SORO DE QUEIJO E GLICEROL  
EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO

SÃO CARLOS -SP

2021

PRISCILLA DE SOUZA ALMEIDA

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DA CO-DIGESTÃO DE SORO DE  
QUEIJO E GLICEROL EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos-SP

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Priscilla de Souza Almeida, realizada em 14/12/2021.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Edson Luiz Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Zaiat (USP)

Prof. Dr. Lucas Tadeu Fuess (USP)

Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues (IMT)

Profa. Dra. Giovanna Lovato (IMT)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Edimar e Alci

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua Divina Providência e infinito Amor! Obrigada pelo dom da vida e por me iluminar durante a realização desse trabalho.

A Nossa Senhora, minha Mãe do Céu, que cuidou de mim e me ajudou nessa caminhada!

Aos meus pais, Edimar e Alci, por todo o amor, orações, ensinamentos, renúncias e esforços para que este nosso sonho pudesse se realizar! Agradeço aos meus irmãos, Julio e Doriana, pelo apoio, carinho e torcida, e em especial ao meu irmão, pelo exemplo! A toda a minha família e familiares, muito obrigada pelo suporte e amor!

Agradeço ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva pela oportunidade, pela sua orientação, dedicação, e por tudo que o senhor me ensinou. Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat e ao Dr. Lucas Tadeu Fuess por terem participado da banca de avaliação do Exame de Acompanhamento e Qualificação, e pelas sugestões que ajudaram a melhorar esta tese. A todos os membros da banca examinadora da defesa da tese, obrigado por aceitar avaliar este trabalho e por suas contribuições.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas do LCA-II que viveram junto comigo esse doutorado! Lucas, obrigado pela paciência e por tudo que me ensinou, pela sua prestatividade e empenho. Camila, obrigada pela nossa amizade, pela ajuda e companheirismo, principalmente nesses dois anos finais que ficamos tão próximas! Lívia e Schayanna, minhas amigas companheiras, muito obrigada pela nossa amizade, por todo o apoio e ajuda sempre, pela cumplicidade, carinho e presença durante todos esses anos, dentro e fora do laboratório! Todos vocês foram essenciais para fazer desses anos em São Carlos uma experiência mais fácil, enriquecedora e feliz. Agradeço aos demais colegas, Alexandre, Andreza, Andressa, Isabele, Kauanna, Yasmin, Carolina e Mariana por todos os momentos compartilhados e crescimento proporcionado.

Agradeço aos meus amigos do PPGEQ, especialmente à Thalyne, pela amizade sincera que construímos juntas e que quero levar para a vida toda.

À Kamilla, que aceitou testar nossa amizade e morar comigo durante esse período em São Carlos. Obrigada pela amizade, companheirismo, ajuda e paciência.

Aos técnicos Oscar e Samuel pela confecção dos reatores e por toda ajuda durante o meu período no LCA-II.

À Dra. Isabel Kimiko Sakamoto e à Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche pela ajuda com as análises microbiológicas, e à Dra. Maria Ângela Talarico Adorno pela ajuda com as análises de cromatografia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar pela oportunidade. À Capes pelo auxílio financeiro e à Fapesp pelo investimento na pesquisa.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

O soro de queijo e o glicerol são subprodutos da indústria de laticínios e do biodiesel gerados abundantemente e, podem ser utilizados no processo de digestão anaeróbia para geração de energia devido ao elevado teor orgânico que apresentam. A adoção da digestão anaeróbia em dois estágios associada à aplicação de co-substratos traz diversas vantagens, como incrementos nas remoções de DQO e produções de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a co-digestão de soro de queijo e glicerol em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) utilizando processo dois estágios, e verificar como a taxa de carregamento orgânico (TCO) e temperatura afetaram a produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Assim, a co-digestão foi realizada em reator metanogênico termofílico de estágio único (RU-T) com TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> aplicando tempo de detenção hidráulico (TDH) de 24 h. Após determinada a concentração ótima, o efeito do TDH foi avaliado em 24, 20 e 16 h. No processo em dois estágios, a TCO do reator acidogênico do primeiro estágio (RA-T) foi aumentada de 60 a 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (TDH 4 h). No reator metanogênico do segundo estágio além do aumento da TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (TDH de 24 h), foi investigado o efeito da temperatura utilizando um reator termofílico (RS-T) e um mesofílico (RS-M). No RU-T, a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> apresentou o melhor desempenho, com rendimento de metano (MY) de 253,0 NmL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub> e produção volumétrica de metano (PVM) de 3,2 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Na avaliação do TDH, o TDH de 20 h forneceu o MY máximo de 292,5 NmL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub>, enquanto a PVM máxima foi observada no TDH de 16 h (5,1 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Ácido acético e propiônico foram os metabólitos dominantes. No processo em dois estágios, o RA-T forneceu rendimento e produção volumétrica de hidrogênio de 1,7 mmol H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> e 3,9 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, ambos na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, tendo como principais metabólitos ácido butírico e acético. O RS-M produziu os maiores MY e PVM, iguais a 273,2 NmL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub> e 5,8 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Já o RS-T exibiu MY de 269,9 NmL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub> na TCO 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e PVM de 4,4 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Ácido acético e isobutírico foram os principais metabólitos. Por meio de análise de sequenciamento, identificou-se como gênero dominante no RA-T *Thermoanaerobacterium*. No RS-M e RU-T as *archaeas* mais abundantes foram do gênero *Methanobacterium* e no RS-T *Methanothermobacter*. De forma geral, atesta-se que TCO acima de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi prejudicial ao RU-T e RS-T, enquanto o RS-M demonstrou estabilidade em 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. O processo em dois estágios exibiu melhor desempenho, entretanto, considerando os resultados da avaliação do TDH no RU-T, verifica-se a possibilidade de aplicar menores TDH no segundo estágio para maiores produções de CH<sub>4</sub>.

**Palavras-chave:** Efeito da TCO. Efeito da Temperatura. Dois estágios. Glicerina. 16S rRNA

## ABSTRACT

Cheese whey and glycerol are by-products of the dairy and biodiesel industry, respectively. Both by-products are highly produced and can be used in the anaerobic digestion process for energy generation due to their high organic content. The adoption of two-stage anaerobic digestion associated with the application of co-substrates brings several advantages, such as increases in COD removal and production of H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>. In this context, the objective of this research was to evaluate the co-digestion of cheese whey and glycerol in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) using a two-stage process, and to verify the effect of organic loading rate (OLR) and temperature on the production of H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>. Thus, the co-digestion was performed in a thermophilic methanogenic reactor (RU-T) by increasing the OLR from 2 to 20 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, with a hydraulic retention time (HRT) of 24 h. After the optimal concentration determination, the HRT was decrease from 24 to 20 and 16 h. For the two-stage process, the OLR of the acidogenic reactor (RA-T) was increased from 60 to 120 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (HRT 4 h) and of the methanogenic reactor from 2 to 20 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (HRT 24 h). Besides, the effect of temperature was investigated in the second stage using a thermophilic (RS-T) and a mesophilic (RS-M) methanogenic reactor. RU-T showed the best performance in the OLR of 10 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, with methane yield (MY) of 253.0 NmL CH<sub>4</sub>.gCOD<sup>-1</sup><sub>rem</sub> and methane production rate (MPR) of 3.2 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. In the HRT evaluation, the HRT of 20 h provided the maximum MY of 292.5 NmL CH<sub>4</sub>.gCOD<sup>-1</sup><sub>rem</sub>, while the maximum MPR was observed in the HRT of 16 h (5.1 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Acetic and propionic acid were the dominant metabolites. Regarding the two-stage process, the RA-T provided a yield of 1.7 mmol H<sub>2</sub>.gCOD<sup>-1</sup><sub>app</sub> and hydrogen production rate of 3.9 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, both in the OLR of 90 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, with butyric and acetic acid as main metabolites. RS-M produced the highest MY and MPR, equal to 273.2 NmL CH<sub>4</sub>.gCOD<sup>-1</sup><sub>rem</sub> and 5.8 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> in the OLR of 20 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. The RS-T showed MY of 269.9 NmL CH<sub>4</sub>.gCOD<sup>-1</sup><sub>rem</sub> in OLR 10 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> and MPR of 4.4 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> in 20 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Acetic and isobutyric acid were the main metabolites. Through sequencing analysis, was identified as dominant genus in RA-T *Thermoanaerobacterium*. Archaeas of the genus *Methanobacterium* was the most abundant in RS-M and RU-T, while the genus *Methanothermobacter* was in RS-T. In general, it is verified that OLR above 10 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> was harmful to RU-T and RS-T, while RS-M showed stability at 20 gCOD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. The two-stage process showed better performance, however, considering the results of the HRT evaluation in the RU-T, there is the possibility of applying smaller HRT in the second stage for higher CH<sub>4</sub> production.

**Keywords:** OLR effect. Temperature effect. Two-stage. Glycerin. 16S rRNA



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Oferta interna de energia por fonte no Brasil em 2019 .....	26
<b>Figura 2</b> - Transição global de sistemas energéticos e perspectivas para o futuro .....	27
<b>Figura 3</b> - Digestão anaeróbia e rotas metabólicas .....	29
<b>Figura 4</b> - Evolução da produção de leite no Brasil de 2007 a 2019 .....	30
<b>Figura 5</b> – Reação de transesterificação .....	40
<b>Figura 6</b> – Produção de glicerina no Brasil entre 2008 e 2019.....	41
<b>Figura 7</b> – Processo em dois estágios para produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> .....	60
<b>Figura 8</b> – Materiais suportes utilizados nos reatores RALF. A) pneu triturado b) cinasita ..	70
<b>Figura 9</b> – Arranjo dos reatores acidogênico, metanogênico e sequenciais .....	70
<b>Figura 10</b> – Esquema do aparato experimental para produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> . (1) depósito afluente, (2) bomba de alimentação (3) reator anaeróbio de leito fluidizado, (4) bomba de reciculação, (5) depósito efluente e (6) banho termostático. ....	71
<b>Figura 11</b> – Fluxograma experimental.....	80
<b>Figura 12</b> - DQO afluente e remoção de DQO no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> .84	
<b>Figura 13</b> – Concentração inicial de carboidratos totais e conversão de carboidrato no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> .....	88
<b>Figura 14</b> – Concentração inicial e conversão de glicerol no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> .....	90
<b>Figura 15</b> – Rendimento de metano e conteúdo de CH <sub>4</sub> no biogás produzido no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	92
<b>Figura 16</b> – Produção volumétrica de metano observada no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	97
<b>Figura 17</b> – Distribuição dos metabólitos (porcentagem molar) do RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h. ....	100
<b>Figura 18</b> – Rendimento e produção volumétrica de metano produzidos no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração afluente de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .....	107
<b>Figura 19</b> – Distribuição de metabólitos (porcentagem molar) no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração afluente de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .....	108
<b>Figura 20</b> – Distribuição dos filamentos bacterianos identificados no RU-T no TDH de 24 h e TCO de (a) 5 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e (b) 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> .....	114
<b>Figura 21</b> – Abundância relativa dos gêneros de archaeas metanogênicas no RU-T nas TCO de 5 e 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	117

<b>Figura 22</b> – Conteúdo de H <sub>2</sub> no biogás e rendimento de hidrogênio no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 4 h .....	122
<b>Figura 23</b> – Produção volumétrica de hidrogênio no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 4 h.....	127
<b>Figura 24</b> - Distribuição dos metabólitos (porcentagem molar) do RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 4 h. ....	130
<b>Figura 25</b> - Abundância relativa (%) dos filos detectados no RA-T nas TCO de (a)60 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> , (b) 90 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e (c) 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> .....	135
<b>Figura 26</b> - Abundância relativa (%) dos gêneros bacterianos presentes no RA-T nas TCO de 60 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> , 90 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> .....	136
<b>Figura 27</b> - DQO inicial e remoção de DQO no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	143
<b>Figura 28</b> - DQO inicial e remoção de DQO no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	144
<b>Figura 29</b> - Concentração inicial de carboidratos totais e remoção de carboidrato no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	147
<b>Figura 30</b> - Concentração inicial de carboidratos totais e conversão de carboidrato no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	148
<b>Figura 31</b> - Concentração inicial e conversão de glicerol no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	149
<b>Figura 32</b> – Concentração inicial e conversão de glicerol no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	150
<b>Figura 33</b> – Rendimento de metano e conteúdo de CH <sub>4</sub> no biogás produzido no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	152
<b>Figura 34</b> – Rendimento de metano e conteúdo de CH <sub>4</sub> no biogás produzido no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	154
<b>Figura 35</b> - Produção volumétrica de metano obtida no RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	160
<b>Figura 36</b> – Abundância relativa dos filos do domínio bacteria no RS-T e RS-M na TCO de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	169
<b>Figura 37</b> – Abundância relativa dos gêneros das archaeas metanogênicas identificadas no RS-T e RS-M na TCO de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	172
<b>Figura 38</b> - Comparação do rendimento de metano observado no RS-T, RU-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	175

<b>Figura 39</b> - Comparação da produção volumétrica de metano observada no RS-T, RU-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH 24 h .....	177
---	-----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Produção de H <sub>2</sub> a partir da fermentação do soro de queijo .....	37
<b>Tabela 2</b> – Produção de CH <sub>4</sub> a partir da digestão anaeróbia do soro de queijo .....	40
<b>Tabela 3</b> – Produção de H <sub>2</sub> a partir da fermentação do glicerol .....	47
<b>Tabela 4</b> – Produção de CH <sub>4</sub> a partir da digestão anaeróbia do glicerol.....	51
<b>Tabela 5</b> – Propriedades físicas da cinasita e do pneu triturado .....	69
<b>Tabela 6</b> – Composição do soro de queijo em pó fornecido pela LeiteSol® .....	72
<b>Tabela 7</b> – Especificações técnicas do glicerol .....	73
<b>Tabela 8</b> – Meio nutricional proposto por Del Nery (1987) .....	73
<b>Tabela 9</b> – Condições operacionais para os reatores acidogênico (RA-T), metanogênicos do processo em dois estágios (RS-T e RS-M) e metanogênico do processo em estágio único (RU-T).....	79
<b>Tabela 10</b> – pH reacional, ácidos orgânicos voláteis e razão AI/AP do reator metanogênico RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	82
<b>Tabela 11</b> – DQO afluente e remoção de DQO no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	84
<b>Tabela 12</b> – Concentração afluente e conversão de carboidratos no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	87
<b>Tabela 13</b> – Concentração afluente e conversão de glicerol no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	89
<b>Tabela 14</b> – Rendimento de metano e composição do biogás produzido no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	91
<b>Tabela 15</b> – Produção volumétrica de metano obtida no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	96
<b>Tabela 16</b> – Concentração dos metabólitos ácidos produzidos no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	101
<b>Tabela 17</b> – pH reacional, concentração de ácidos orgânicos voláteis e razão AI/AP no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .....	103
<b>Tabela 18</b> – Remoção de DQO, carboidratos totais e glicerol no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .....	105
<b>Tabela 19</b> – Rendimento, produção volumétrica e conteúdo de CH <sub>4</sub> no biogás do RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .....	105
<b>Tabela 20</b> – Concentração dos metabólitos ácidos produzidos no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L <sup>-1</sup> .....	109

<b>Tabela 21</b> – Balanço de DQO realizado no RU-T .....	111
<b>Tabela 22</b> – Parcela de DQO afluente convertida a CH <sub>4</sub> no RU-T.....	112
<b>Tabela 23</b> - Conversão de DQO, carboidrato e glicerol no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 4 h .....	118
<b>Tabela 24</b> – Composição do biogás, rendimento e produção volumétrica de hidrogênio no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 4 h.....	122
<b>Tabela 25</b> - Comparação de trabalhos que utilizaram soro de queijo e glicerol para produção de H <sub>2</sub> .....	126
<b>Tabela 26</b> - Principais metabólitos produzidos no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> .....	129
<b>Tabela 27</b> – Balanço de DQO no RA-T .....	134
<b>Tabela 28</b> - pH reacional, ácidos orgânicos voláteis e razão AI/AP dos reatores RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	141
<b>Tabela 29</b> – DQO afluente e remoção de DQO no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	142
<b>Tabela 30</b> – DQO afluente e remoção de DQO no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h.....	144
<b>Tabela 31</b> – Concentração afluente e conversão de carboidratos do RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	146
<b>Tabela 32</b> – Concentração afluente e conversão de carboidratos no RS-M nas TCO 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	147
<b>Tabela 33</b> – Concentração afluente e conversão de glicerol no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	149
<b>Tabela 34</b> – Concentração afluente e conversão de glicerol no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	150
<b>Tabela 35</b> – Rendimento de metano e composição do biogás produzido no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	151
<b>Tabela 36</b> – Rendimento de metano e composição do biogás produzido no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	153
<b>Tabela 37</b> - Trabalhos de digestão anaeróbia em processo dois estágios que utilizaram soro de queijo, água residuária de laticínios e glicerol como substrato e co-substrato .....	157
<b>Tabela 38</b> – Produção volumétrica de metano observada no RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	159

<b>Tabela 39</b> – Concentração dos metabólitos ácidos produzidos no RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> e TDH de 24 h .....	163
<b>Tabela 40</b> – Balanço de DQO no RS-T e RS-M.....	166
<b>Tabela 41</b> – DQO afluyente convertida a CH <sub>4</sub> no RS-T e RS-M .....	167
<b>Tabela 42</b> - Principais resultados obtidos no RA-T, RS-T, RS-M e RU-T.....	178
<b>Tabela 43</b> - Potencial energético do RA-T, RS-T, RU-T e RS-M nas TCO estudadas .....	180

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: ácidos graxos voláteis

AI: alcalinidade intermediária

ANP: Agência Nacional de Petróleo

AnSBBR - reator anaeróbio batelada sequencial com biomassa imobilizada (*anaerobic sequencing batch biofilm reactor*)

AOV: ácidos orgânicos voláteis

AP: alcalinidade parcial

APHA: Associação Americana de Saúde Pública (*American Public Health Association*)

ASBR: reator anaeróbio batelada sequencial (*anaerobic sequencing batch reactor*)

ASTBR: reator anaeróbio de leito estruturado (*anaerobic structured bed reactor*)

CSTR: reator contínuo de mistura perfeita (*continuous stirred tank reactor*)

DanF: filtro anaeróbio de fluxo descendente (*downflow anaerobic filter packed*)

DIET: transferência direta de elétrons interespecies (*direct interspecies electron transfer*)

DQO: demanda química de oxigênio

DQO<sub>Eq</sub>: soma das DQO equivalentes de cada composto do efluente

DQO<sub>Ex</sub>: DQO experimental efluente

EGSB: reator de leito granular expandido (*expanded granular sludge bed reactor*)

EPE: Empresa de Pesquisa Energética

FAO: Food and Agriculture Organization

HAc: ácido acético

HBu: ácido butírico

HCa: ácido caprótico

HFo: ácido fórmico

HIsBu: ácido isobutírico

HIsVa: ácido isovalérico

HLA: ácido láctico

HLe: ácido levulínico

HPr: ácido propiônico

HVa: ácido valérico

HY: rendimento de hidrogênio (*hydrogen yield*)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBR: reator de leito induzido (*induced bed reactor*)

LAB: bactérias produtoras de ácido láctico (*lactic acid bacteria*)

MDIC: Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio Exterior e Serviços

MY: rendimento de metano (*methane yield*)

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

PABR: reator anaeróbio compartimentado periódico (*periodic anaerobic baffled reactor*)

PBR: reator de leito fixo empacotado (*packed bed reactor*)

PCI: poder calorífico inferior

PD: 1,3-propanodiol

pH: potencial hidrogeniônico

POME: efluente de óleo de palma (*palm oil mill effluent*)

PVH: produção volumétrica de hidrogênio

PVM: produção volumétrica de metano

RALF: reator anaeróbio de leito fluidizado

RA-T: reator acidogênico termofílico

RS-M: reator metanogênico sequencial mesofílico

RS-T: reator metanogênico sequencial termofílico

RU-T: reator metanogênico termofílico de fase única

SAOB: bactérias sintróficas oxidadoras de acetato (*syntrophic acetate oxidizing bacteria*)

SBR: reator batelada sequencial (*sequencing batch reactor*)

SECEX: Secretaria de Comércio Exterior

SRT: tempo de retenção de sólidos (*solid retention time*)

SST: sólidos suspensos totais

SSV: sólidos suspensos voláteis

ST: sólidos totais

SV: sólidos voláteis

TCO: taxa de carregamento orgânico

TDH: tempo de detenção hidráulica

UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*)

%H<sub>2</sub>: porcentagem de H<sub>2</sub> no biogás

%CH<sub>4</sub>: porcentagem de metano no biogás

DQO<sub>E</sub>: DQO efluente



$n_{H_2}$ : produção molar de hidrogênio

$v_m$ : volume de biogás

$D_p$ : diâmetro da partícula

$DQO_A$ : DQO afluente

$PCI_{CH_4}$ : poder calorífico inferior do metano

$PCI_{H_2}$ : poder calorífico inferior do hidrogênio

$PE_{CH_4}$ : potencial energético do metano

$PE_{H_2}$ : potencial energético do hidrogênio

$Q$ : vazão média afluente

$Q_g$ : vazão de biogás

$R^2$ : coeficiente de determinação

$t$ : tempo

$V$ : volume total do reator

$V_{mf}$ : velocidade de mínima fluidização

$\rho_{CH_4}$ : densidade do  $CH_4$

$\rho_{H_2}$ : densidade do  $H_2$

$\rho_p$ : densidade da partícula

apli: aplicada

cons: consumida

rem: removida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
2.1. Energia renovável e sua importância.....	25
2.2. Hidrogênio e metano como compostos energéticos .....	26
2.3. Digestão anaeróbia .....	27
2.4. Soro de queijo: Produção mesofílica e termofílica de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> .....	30
2.4.1. Produção de hidrogênio.....	32
2.4.2. Produção de metano .....	37
2.5. Glicerol: Produção mesofílica e termofílica de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> .....	40
2.5.1. Produção de hidrogênio.....	43
2.5.2. Produção de metano .....	48
2.6. Processos mesofílicos e termofílicos de co-digestão com soro de queijo e glicerol .....	51
2.7. Processos mesofílicos e termofílicos em dois estágios com soro de queijo e glicerol...	59
2.8. Considerações finais .....	67
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	69
3.1. Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF).....	69
3.2. Águas residuárias.....	71
3.3. Inóculo .....	74
3.4. Análises de monitoramento da operação .....	74
3.5. Análise da comunidade microbiana.....	75
3.6. Cálculo dos indicadores de desempenho .....	75
3.7. Procedimento experimental .....	77
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	81
4.1. Processo em um estágio – Reator Metanogênico Termofílico (RU-T).....	81
4.1.1. Influência da concentração de substratos no desempenho do RU-T.....	81
4.1.1.1. Rendimento e produção volumétrica de metano no RU-T.....	90

4.1.1.2. Metabólitos solúveis no RU-T .....	99
4.1.2. Influência do tempo de detenção hidráulica no desempenho do RU-T .....	103
4.1.2.1. Rendimento e produção volumétrica de metano no RU-T.....	105
4.1.2.2. Metabólitos solúveis.....	108
4.1.3. Balanço de DQO no RU-T.....	109
4.1.4. Análise da comunidade microbiana do RU-T.....	112
4.2. Processo em dois estágios – Reator Acidogênico Termofílico (RA-T) .....	117
4.2.1. Rendimento e produção volumétrica de hidrogênio no RA-T .....	121
4.2.2. Metabólitos solúveis – RA-T .....	129
4.2.3. Balanço de DQO no RA-T .....	133
4.2.4. Análise da comunidade microbiana do RA-T.....	135
4.3. Processo em dois estágios - Reatores Metanogênicos Sequenciais Termofílico e Mesofílico (RS-T e RS-M) .....	140
4.3.1. Rendimento e produção volumétrica de metano no RS-T e RS-M.....	151
4.3.2. Metabólitos solúveis dos reatores metanogênicos sequenciais – RS-T e RS-M...	162
4.3.3. Balanço de DQO no RS-T e RS-M.....	165
4.3.4. Análise da comunidade microbiana do RS-T e RS-M.....	167
4.4. Comparação do processo em um estágio e do processo em dois estágios na produção de CH <sub>4</sub> .....	174
4.5. Potencial energético.....	179
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>182</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>184</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>185</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo mundial de energia vem sofrendo um crescimento acentuado desde a Revolução Industrial, sendo os recursos de origem fóssil a base energética para o desenvolvimento da sociedade ao longo dos anos (GOLDEMBERG, 2009). No entanto, devido aos problemas ambientais gerados pelo consumo destes recursos e a finitude desses materiais, uma intensa busca por fontes alternativas é observada atualmente, na qual o objetivo é a diversificação do setor energético, tornando-o cada vez mais renovável.

Diante das circunstâncias apontadas, o hidrogênio mostrou-se um potencial carreador energético, pois apresenta um elevado poder calorífico,  $120 \text{ MJ.kg}^{-1}$ , em comparação com alguns combustíveis fósseis, como a gasolina ( $46,4 \text{ MJ.kg}^{-1}$ ) e o diesel automotivo ( $45,6 \text{ MJ.kg}^{-1}$ ), e com o etanol ( $29,6 \text{ MJ.kg}^{-1}$ ) (NI et al., 2006). O gás metano também se mostra favorável para o cenário energético renovável devido ao alto potencial calorífico que dispõe,  $50 \text{ MJ.kg}^{-1}$ , o qual pode ser utilizado, por exemplo, para geração de energia elétrica e cogeração. No entanto, apesar de suas vantagens, a aplicabilidade desses combustíveis gasosos em larga escala enfrenta como dificuldade seu armazenamento e transporte em razão da baixa densidade que possuem. Uma maneira de minimizar tais problemas seria a adoção de processos nos quais a produção e consumo de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  sejam realizadas no próprio local onde se encontra a matéria prima, possibilitando também uma descentralização da produção de energia.

Os processos biológicos acabaram ganhando atenção na produção de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ , devido ao caráter sustentável que apresentam, pois é possível utilizar recursos de origem não-fóssil, como rejeitos industriais e domésticos, e diminuir os impactos ambientais que seriam ocasionados pelo descarte da matéria orgânica não estabilizada destes materiais. Outra característica que faz desta técnica promissora é o fato de os microrganismos atuarem em condições ambientes, ao contrário do que ocorre nos processos eletrolíticos e térmicos que necessitam de muita energia (DAS; VEZIROGLU, 2008). Na digestão anaeróbia, o processo ocorre na ausência de oxigênio, resultando na conversão de compostos orgânicos complexos, como carboidratos, proteínas e lipídios, em metano e gás carbônico (CAMPOS, 1999). O hidrogênio é um produto intermediário neste processo e, portanto, para sua obtenção é necessário interromper o seu consumo na fase metanogênica. Como a digestão anaeróbia deve ser interrompida antes da metanogênese para que o  $\text{H}_2$  possa ser coletado, a matéria orgânica presente inicialmente acaba por não ser removida. Além disso, não se obtém  $\text{CH}_4$  como produto. Uma maneira de solucionar essa questão é adotar uma produção em dois estágios, na qual é possível a produção simultânea de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  (CREMONEZ et al., 2021). No primeiro estágio tem-se a produção de  $\text{H}_2$ , ocasionada pela atividade de microrganismos acidogênicos,

e no segundo estágio é realizada a metanogênese, produzindo CH<sub>4</sub>. A separação das fases acidogênica e metanogênica ainda pode proporcionar maiores produções de metano devido à possibilidade de estabelecer em cada reator as condições mais apropriadas para realização das atividades metabólicas específicas de cada grupo de microrganismos (GIOANNIS et al., 2017). Além de incrementos na produção de metano, a aplicação do processo em dois estágios apresenta maior tolerância a elevadas taxas de carregamento orgânico, maior estabilidade e maiores eficiências de remoção de matéria orgânica do que o processo em estágio único (CREMONEZ et al., 2021), ou seja, quando todas as etapas de conversão do substrato acontecem em um único reator.

Dentre os reatores utilizados na digestão anaeróbia, seja em estágio único ou em dois estágios, o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) possibilita tratamento eficiente de materiais solúveis ou suspensos que são altamente biodegradáveis. Tal fato se deve a sua tolerância a altas taxas de carregamento orgânico e a possibilidade da utilização de baixos tempos de detenção hidráulica (TDH), além de possuir um eficiente contato entre o substrato e a biomassa, e elevados coeficientes de transferência de massa (MAO et al., 2015; RAMOS; SILVA, 2020). Dessa forma, este biorreator é adotado no tratamento de diferentes materiais, como vinhaça de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2014; REIS et al., 2015), soro de queijo (OTTAVIANO et al., 2017; SILVA et al., 2019), glicerol (NAZARETH et al., 2018), manipueira (AMORIM et al., 2014; ROSA et al., 2014a), glicose (BARROS; SILVA, 2012; YESHANEW et al., 2016; CISNEROS-PÉREZ et al., 2017), entre outros (FERNÁNDEZ et al., 2008; GULSEN; TURAN; ARMAGAN, 2004; KUO et al., 2011; WEI et al., 2011), sendo observado também seu emprego em operações em dois estágios (BULL; STERRITT; LESTER, 1984; WU et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2020; RAMOS et al., 2021). No entanto, o uso da configuração em dois estágios neste reator ainda é uma área pouco explorada, não sendo observado na literatura muitos trabalhos a respeito.

No contexto atual, a digestão anaeróbia tem sido amplamente estudada como maneira de reaproveitamento de diferentes resíduos, como por exemplo glicerol residual e soro de queijo (WAINAINA et al., 2019). O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios, composto por alta quantidade de matéria orgânica biodegradável (50 – 102 gDQO.L<sup>-1</sup>) (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). Devido ao seu elevado conteúdo orgânico e suas propriedades físico-químicas, como por exemplo o pH variável (3,3 – 9,0), este subproduto por muitas vezes pode ser tratado como um resíduo prejudicial ao meio ambiente caso não ocorra o aproveitamento do soro de queijo e sua destinação final seja o descarte (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Estima-se que apenas metade do volume de soro de queijo

gerado seja reutilizado, sendo os outros 50% descartados no meio ambiente sem tratamento (ASUNIS et al., 2020). Por apresentar matéria orgânica altamente biodegradável e se tratar de um resíduo rico em carboidratos ( $0,18 - 60 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  de lactose) (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012), o soro de queijo tem sido estudado por diversos autores para produção de hidrogênio (PERNA et al., 2013; ROSA, 2014; RAMOS et al., 2020) e de metano (FERNÁNDEZ et al., 2015; JO; KIM; LEE, 2016; CRUZ-SALOMÓN et al., 2020), sendo observado na literatura ao aplicar reatores contínuos rendimentos de até  $5,8 \text{ mmol de H}_2\cdot\text{gDQO}^{-1}$  (OTTAVIANO et al., 2017) e de  $0,28 - 0,34 \text{ L de CH}_4\cdot\text{gDQO}^{-1}$  (JO; KIM; LEE, 2016). Além da utilização deste substrato em processos de fermentação e digestão anaeróbia em estágio único, observa-se também a sua aplicabilidade em operações em dois estágios (ANTONOPOULOU et al., 2008; DAREIOTI; KORNAROS, 2015; FERNÁNDEZ et al., 2015; FONTANA et al., 2018b; VENETSANEAS et al., 2009; ZHONG; STEVENS; HANSEN, 2015).

Apesar dos resultados favoráveis à produção de biogás, a digestão do soro de queijo pode apresentar problemas referentes a acúmulo de ácidos orgânicos voláteis devido à baixa alcalinidade que possui (ASUNIS et al., 2020). Assim, a aplicação de co-substrato com alta capacidade de tamponamento, como por exemplo glicerol (LOVATO et al., 2016), seria uma estratégia razoável para contornar esse problema. Glicerol é o principal subproduto da produção de biodiesel, comumente aplicado no setor farmacêutico, alimentício e cosmético (MONTEIRO et al., 2018). Apesar da sua versatilidade com relação a sua utilização em diferentes segmentos industriais, o volume gerado deste composto tem sido capaz de suprir a sua demanda e ainda se verifica um excedente de glicerol (MONTEIRO et al., 2018). Esse excedente acaba se tornando um resíduo do processo que deve ser tratado antes de seu descarte em razão do elevado nível poluidor que possui. Assim, a aplicação do glicerol como co-substrato para produção de biogás pode agregar valor a este resíduo e beneficiar a produção de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  nos processos anaeróbios, sendo observado seu uso recorrentemente (RIVERO; SOLERA; PEREZ, 2014; ZAHEDI et al., 2016, 2018; CHOU; SU, 2019; PEREYRA et al., 2020). Como atestado por Lovato et al. (2017) e Lovato et al. (2016), a co-digestão do soro de queijo com o glicerol é uma estratégia interessante para produção de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ , já que incrementos na produção desses biocombustíveis podem ser observados em relação a mono-digestão do soro e a mono-digestão do glicerol. De maneira geral, além de auxiliar no controle do pH, a adoção de co-digestão possibilita diluição de substâncias tóxicas e/ou inibitórias para o processo, aumento na quantidade de matéria orgânica biodegradável, complementação nutricional, sinergismo microbiano e incrementos no rendimento de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$

(ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019; GHIMIRE et al., 2017; LOVATO et al., 2017).

Apesar de ter se mostrado promissora, a co-digestão do soro de queijo e glicerol ainda não foi amplamente estudada na literatura, sendo observados poucos trabalhos, os quais aplicaram condição mesofílica e reatores do tipo batelada (MIRZOYAN; TRCHOUNIAN; TRCHOUNIAN, 2019), batelada sequencial com biomassa imobilizada (AnSBBR) (LOVATO et al., 2016, 2017, 2020) e reator de leito granular expandido (EGSB) (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017). Neste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar a co-digestão do soro de queijo e do glicerol em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) utilizando processo de digestão anaeróbia em dois estágios para recuperação energética de  $H_2$  e  $CH_4$ .

### **Hipóteses e objetivos**

Com base nos fundamentos teóricos envolvidos no processo estudado e observando o comportamento e os resultados referentes a fermentação/digestão anaeróbia de soro de queijo e glicerol na literatura, foram traçadas as seguintes hipóteses e objetivos para este trabalho:

Hipótese 1: A co-digestão do soro de queijo com o glicerol irá apresentar desempenho estável na produção de  $H_2$  e  $CH_4$  em reator RALF, já que a utilização desses substratos em RALF se mostrou eficiente (COSTA et al., 2021; KARADAG et al., 2015; OTTAVIANO et al., 2017; SIMÕES et al., 2021). Apesar da digestão anaeróbia do glicerol também apresentar acidificação do meio, a literatura aponta que este fato ocorre quando proporção a partir de 1% é utilizada, sendo que abaixo deste valor o glicerol exerce sua capacidade tamponante eficientemente (FERREIRA; VOLSCHAN JR; CAMMAROTA, 2018a). Neste trabalho, a proporção de glicerol variou de 0,08-0,8%. Espera-se também que sejam observadas as maiores produções de  $H_2$  e  $CH_4$  nas maiores concentrações afluente aplicadas, devido à disponibilidade de fontes de C para os microrganismos. No entanto, acredita-se que no intervalo de concentração de substratos estudado seja atingido o ponto de sobrecarga do reator, no qual o acréscimo da TCO se torna prejudicial ao processo.

- **Objetivo:** Avaliar a estabilidade e continuidade da produção de hidrogênio e metano em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) e avaliar como o aumento na TCO por meio de variações na concentração de substrato afeta o processo em estágio único e em dois estágios.

Hipótese 2: O decréscimo no TDH no reator metanogênico de estágio único resultará em desempenhos inferiores ao apresentado no TDH de 24 h, uma vez que na digestão anaeróbia de soro de queijo verifica-se instabilidades com aplicação de baixos TDH, sendo usualmente utilizado TDH em torno de dias (ASUNIS et al., 2020).

- Objetivo: Avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção de metano no reator metanogênico de estágio único.

Hipótese 3: O processo em dois estágios apresentará resultados melhores do que o processo em estágio único sob as mesmas condições operacionais, como consequência da otimização de parâmetros em cada etapa da digestão anaeróbia. Além disso, problemas referentes à acidificação do reator e, conseqüentemente, adequação às condições apropriadas para atividade das *archaeas* metanogênicas serão minimizados, uma vez que a etapa acidogênica e metanogênica ocorrerão em reatores separados.

- Objetivo: Comparar os resultados de consumo de substratos, DQO, rendimento e produção volumétrica de metano do processo em dois estágios com o processo em estágio único e determinar o potencial energético de cada condição estudada. Além disso, objetiva-se correlacionar as comunidades microbianas determinadas nos reatores aos seus respectivos desempenhos.

Hipótese 4: O processo em dois estágios com a configuração reator acidogênico termofílico seguido de reator metanogênico termofílico fornecerá produções de CH<sub>4</sub> mais elevadas do que a configuração reator acidogênico termofílico seguido de reator metanogênico mesofílico, uma vez que a literatura aponta maiores taxas de reação e produção de biogás em sistemas termofílicos (COSTA et al., 2021; NIE et al., 2021).

- Objetivo: Analisar o efeito da temperatura nos reatores metanogênicos do processo em dois estágios, e assim determinar qual configuração é mais adequada: reator acidogênico termofílico seguido de reator metanogênico termofílico, ou reator acidogênico termofílico seguido de reator metanogênico mesofílico;



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados alguns conceitos para fundamentação deste trabalho, além de apresentar os principais resultados observados na literatura referentes à produção de hidrogênio e metano por meio do processo de digestão anaeróbia. Maior ênfase será dada às pesquisas que utilizaram soro de queijo e glicerol como substratos, e aplicaram a co-digestão e a produção sequencial de  $H_2$  e  $CH_4$  adotando um sistema em dois estágios.

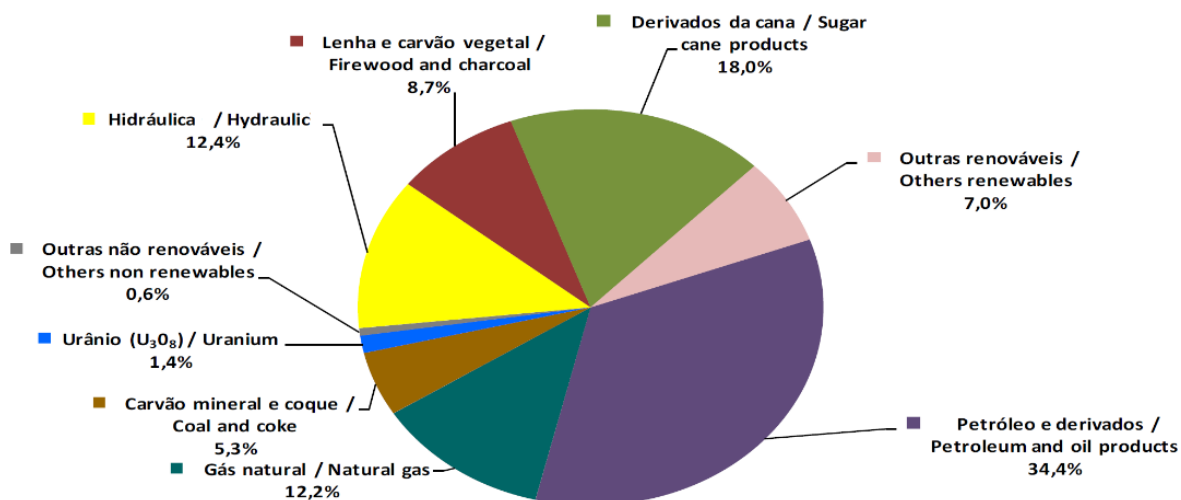
### 2.1. Energia renovável e sua importância

Com o crescimento populacional e desenvolvimento da indústria a partir do século XIX, a demanda por energia tornou-se uma das principais questões da sociedade. Baseado inicialmente no consumo de biomassa (madeira e resíduos agrícolas), o cenário energético sofreu uma considerável mudança com a inserção dos motores de combustão interna, prevalecendo dessa forma o uso do carvão como fonte de energia e, posteriormente, décadas a frente, a utilização do petróleo e gás natural (GOLDEMBERG, 2017). Atualmente, as energias não renováveis constituem grande parte da oferta energética mundial (cerca de 86,3%, segundo a EPE). No entanto, o seu uso acarreta a emissão de gases intensificadores do efeito estufa, como o  $CO_2$ , os quais são prejudiciais ao meio ambiente. Dessa forma, as fontes renováveis estão sendo cada vez mais inseridas no mercado com o objetivo de diversificar a matriz energética dos países e, conseqüentemente, mitigar mudanças climáticas. Além de colaborarem com a questão da emissão de poluentes, as fontes alternativas de energia são um escape à dependência de preços e disponibilidade dos combustíveis fósseis. Assim, a obtenção de uma matriz energética mais limpa tornou-se propósito da sociedade, e diversas fontes alternativas têm sido exploradas, juntamente com o desenvolvimento de novas tecnologias, para que essa porção de energia se torne maior.

O Brasil possui matriz energética com considerável parcela de fontes renováveis, as quais, em 2019, compuseram 46,1% da oferta interna, como apresentado na Figura 1, sendo superior à média mundial determinada em 2017 de 13,9% (EPE, 2020). Entretanto, destaca-se que, apesar de renováveis, algumas fontes exploradas no Brasil, como a energia hidráulica, não são consideradas sustentáveis, pois seu uso acarreta impactos ambientais causados com a mudança do curso de rios, alagamento de áreas, dentre outros fatores.

A parcela de biogás na oferta interna de energia brasileira encontra-se incluída na seção ‘outras renováveis’, e ainda é muito baixa em comparação às demais fontes, correspondendo a 1,3% da soma de ‘outras renováveis’, ou seja, menos de 0,1% da oferta total. De acordo com o Balanço Energético Nacional de 2020, os estados do Rio de Janeiro e São

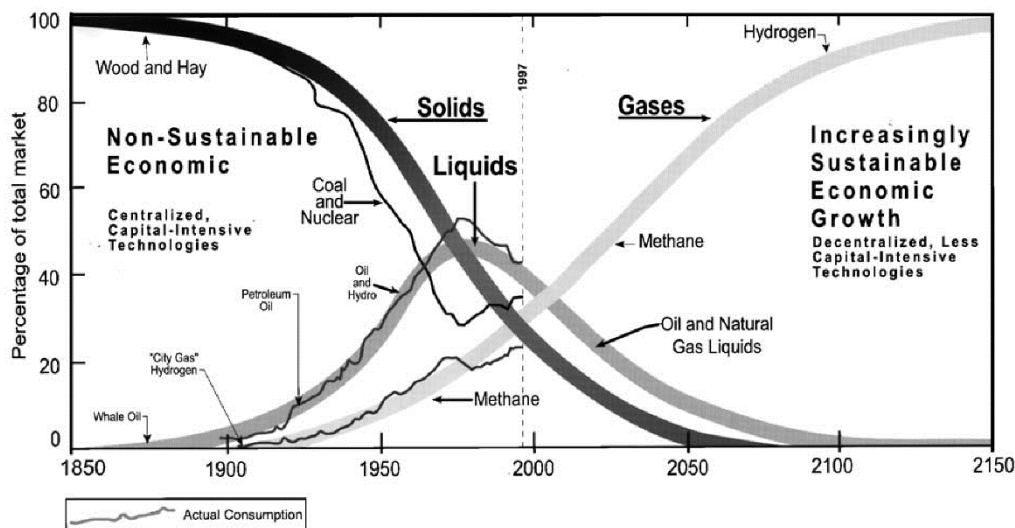
Paulo são os que possuem maior capacidade instalada de geração de eletricidade a partir de biogás.



**Figura 1** - Oferta interna de energia por fonte no Brasil em 2019. Fonte: (EPE, 2020)

## 2.2. Hidrogênio e metano como compostos energéticos

No contexto das energias renováveis, os gases metano e hidrogênio desempenham um importante papel por apresentarem potencial energético elevado e serem obtidos através de diversas fontes alternativas, como resíduos orgânicos industriais e domésticos. Além disso, de acordo com Chynoweth, Owens e Legrand (2001) e Macdonald (1990), a combustão de CH<sub>4</sub> produz menos poluentes atmosféricos e gera menos CO<sub>2</sub> por unidade de energia quando comparado com outros combustíveis fósseis. Já o H<sub>2</sub> ao ser submetido ao processo de queima gera somente água como produto (DUTTA, 2014), demonstrando dessa forma o caráter sustentável desses combustíveis. Na Figura 2 é possível observar o avanço na substituição dos combustíveis sólidos para os gasosos ao longo dos anos com destaque para o CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>, sendo estes almejados como os combustíveis do futuro. Também se nota o processo de descarbonização das fontes energéticas, no qual a razão H/C se tornou maior nas moléculas dos compostos. Dentre as diversas aplicações do hidrogênio e do metano como fontes de energia, pode-se destacar o uso em células a combustível e em processos de cogeração.



**Figura 2** - Transição global de sistemas energéticos e perspectivas para o futuro. Fonte: (Hefner III, 2002)

O hidrogênio pode ser obtido por diferentes tecnologias, dentre elas: eletrólise da água, reforma a vapor de gás natural, reforma do gás resultante da gaseificação de biomassas, processos fotossintéticos e fermentação escura. Os processos biológicos (fotossintéticos e fermentação escura) apresentam como vantagem o fato dos microrganismos atuarem em condições ambientes, ao contrário do que ocorre nos processos eletrolíticos e térmicos que necessitam de muita energia (DAS; VEZIROGLU, 2008). Além do mais, o hidrogênio pode ser produzido no próprio local onde se encontra a matéria prima, minimizando custos com transporte e descentralizando a produção de energia (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

Metano também pode ser gerado por processos térmicos ou biológicos (digestão anaeróbia). No entanto, os processos térmicos que utilizam biomassa necessitam que materiais com baixo teor de água sejam utilizados, uma vez que uma parcela da energia é gasta na evaporação da água para que sejam atingidas as altas temperaturas requeridas no processo (CHYNOWETH; OWENS; LEGRAND, 2001). Dessa maneira, a digestão anaeróbia mostra-se interessante por não demandar restrições quanto à matéria orgânica a ser utilizada, exceto quanto à biodegradabilidade, além de ocorrer em condições amenas.

### 2.3. Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia consiste em um processo no qual microrganismos, atuantes na ausência de oxigênio, convertem compostos orgânicos complexos em metano e gás carbônico

por meio de suas atividades metabólicas (CAMPOS, 1999). De acordo com Chernicharo (2007), 50 a 70% do material biodegradável é transformado em metano, e cerca de 5 a 15% resultam em biomassa microbiana.

Este processo constitui-se das seguintes etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Quando há presença significativa de sulfatos no substrato, a etapa de sulfetogênese se faz presente, acarretando a formação de gás sulfídrico e CO<sub>2</sub>. A seguir são descritas as etapas da digestão anaeróbia assim como apresentado por Harper e Pohland, (1986):

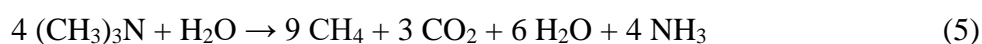
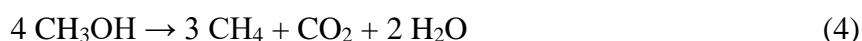
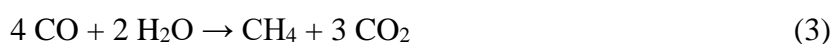
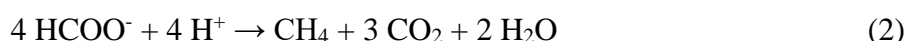
Hidrólise: Nesta etapa, materiais complexos, como carboidratos, proteínas e lipídios, são convertidos a compostos dissolvidos de menor peso molecular.

Acidogênese: Os compostos solúveis originados na etapa anterior são utilizados pelas bactérias fermentativas acidogênicas para a produção de substâncias mais simples, como ácidos orgânicos, sobretudo ácido acético, propiônico e butírico, álcoois, cetonas, dióxido de carbono, hidrogênio e novas células bacterianas.

Acetogênese: Posteriormente a acidogênese, tem-se a fase da acetogênese, na qual as bactérias sintróficas acetogênicas oxidam os produtos intermediários obtidos anteriormente a compostos adequados para a etapa final da digestão anaeróbia, como acetato, hidrogênio e dióxido de carbono.

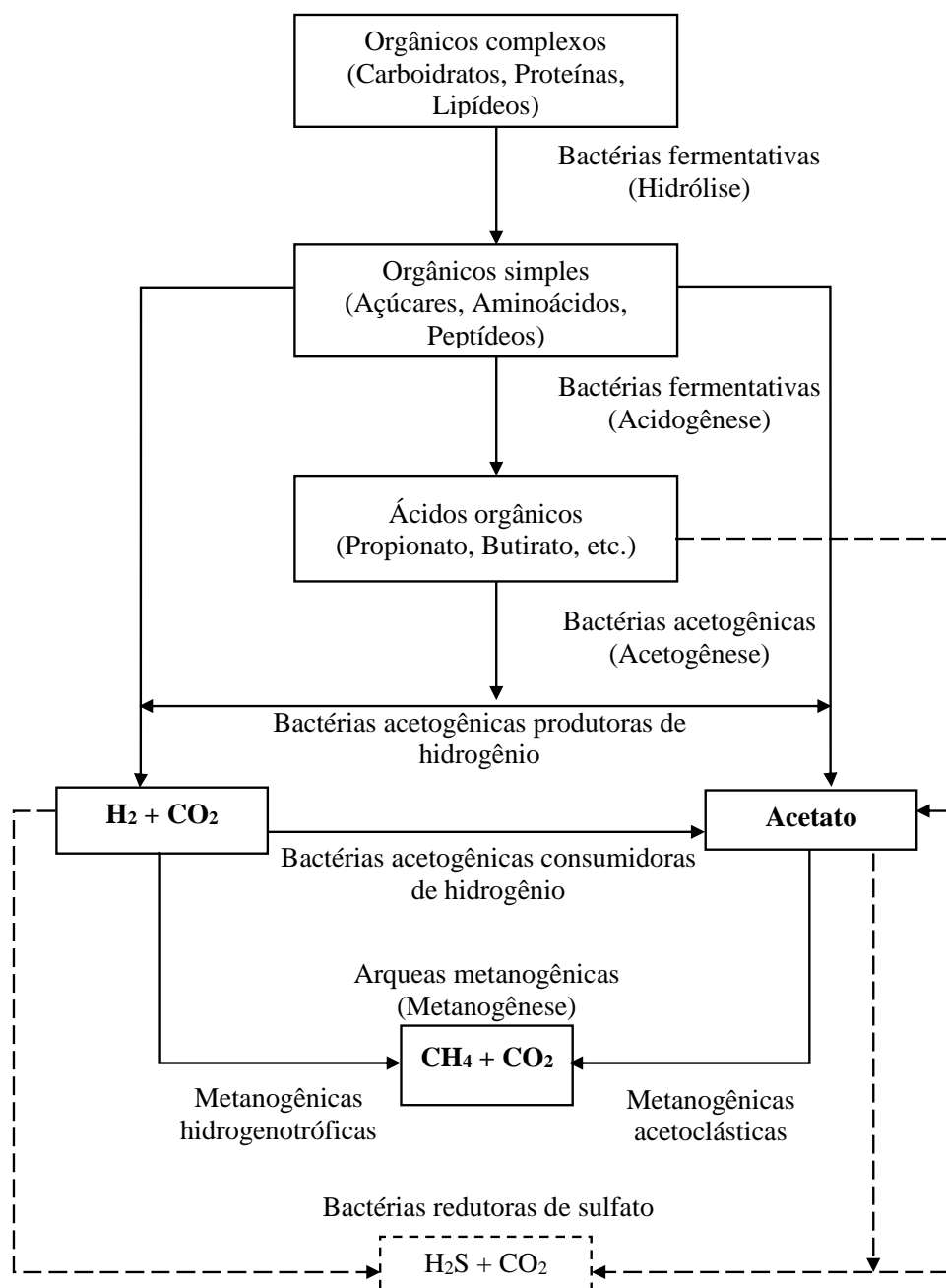
Metanogênese: Por fim, os produtos oriundos das etapas anteriores são convertidos a metano e dióxido de carbono pelas *archaeas* metanogênicas. Tais microrganismos são estritamente anaeróbios e possuem uma cinética de crescimento mais lenta do que as bactérias acidogênicas. Dependendo do substrato consumido, as *archaeas* metanogênicas podem ser divididas principalmente em metanogênicas acetoclásticas, as quais utilizam acetato como fonte de energia, e em metanogênicas hidrogenotróficas, consumidoras de hidrogênio para formação de metano.

A seguir são apresentadas algumas reações que ocorrem na digestão anaeróbia para formação de metano (METCALF & EDDY, 2003). Cerca de 72% do CH<sub>4</sub> gerado na digestão anaeróbia provem da Equação 6.





Na Figura 3 é apresentado um esquema simplificado das rotas metabólicas e grupos microbianos que fazem parte da digestão anaeróbia. Observa-se que metano é o produto final resultante da atividade das *archaeas* metanogênicas, e para a sua formação ocorre o consumo de acetato e hidrogênio produzido pelas bactérias acidogênicas e acetogênicas. Portanto, para recuperação do hidrogênio formado pelas bactérias fermentativas é necessário que haja a eliminação das *archaeas* metanogênicas.



**Figura 3** - Digestão anaeróbia e rotas metabólicas. Fonte: Chernicharo (2007)

#### 2.4. Soro de queijo: Produção mesofílica e termofílica de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, a produção nacional de leite no Brasil em 2019 foi de aproximadamente 34,8 bilhões de litros, com as regiões sudeste e sul liderando o ranking da produção. Em 2019, o Brasil ocupou a 5ª posição na classificação mundial dos maiores produtores de leite (FAO), com a Índia em 1º lugar no ranking. Na Figura 4 é apresentada a evolução da produção de leite de 2007 a 2019 de acordo com os dados fornecidos pelo IBGE.



**Figura 4** - Evolução da produção de leite no Brasil de 2007 a 2019. Fonte: IBGE

O leite movimentava uma grande parcela do mercado alimentício com o consumo do próprio leite, queijos, manteiga, iogurte, doce de leite, dentre outros produtos lácteos. Segundo Paula, Carvalho e Furtado (2009), aproximadamente 30% do leite produzido mundialmente tem como destino a fabricação de queijo. Estima-se que em 2019 cerca de 775 mil toneladas de queijo foram produzidas no Brasil, correspondendo a um aumento de 1,97% em relação à 2018 (MILKPOINT, 2019).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ, o processo de confecção do queijo consiste basicamente nas seguintes etapas: coagulação do leite, corte da coalhada para liberação do soro, enformagem, prensagem, salga, maturação e embalagem.

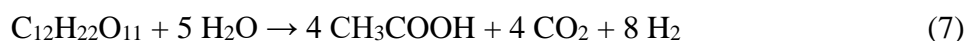
O soro de queijo é o principal efluente da indústria de laticínios, sendo que para cada quilo de queijo produzido, cerca de 9 kg de soro são gerados (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Apresentando um elevado conteúdo orgânico (50 a 102 kgDQO.m<sup>-3</sup>) (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013), o soro de queijo é composto majoritariamente por lactose, 39-60 kg.m<sup>-3</sup> (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Em razão da sua

composição orgânica, este rejeito possui um elevado potencial poluidor, e, portanto, não deve ser descartado sem um tratamento prévio.

Como forma de reaproveitamento, devido ao seu alto valor nutricional, este resíduo tem sido aplicado no próprio setor alimentício, sendo manipulado com o propósito de concentrar o soro de queijo, para extração da lactose pura e recuperação de proteínas (LOPES, 2015). Assim, as indústrias acabam minimizando gastos com tratamento e agregando valor ao soro. Porém, apesar de seu reaproveitamento na indústria alimentícia, de acordo com Asunis et al. (2020), apenas cerca de 50% do soro de queijo é processado. No Brasil, os dados sobre o soro de queijo são imprecisos pois uma grande parte do queijo produzido no país ocorre em pequenas empresas, as quais o utilizam para alimentação animal ou descartam em rios (IEA, 2013). No entanto, analisando os dados referentes à importação de soro, é possível verificar que no Brasil não é realizado um aproveitamento eficiente do soro de queijo, visto que o país ocupa a 4ª posição no ranking mundial de produção de queijo (MDIC, 2018), e ainda assim, importa mensalmente mais de 1.000 toneladas de soro, resultando em um saldo negativo na balança comercial láctea (SECEX).

Devido ao seu considerável conteúdo de carboidratos, o soro de queijo é um substrato apropriado para microrganismos acidogênicos/metanogênicos, e dessa forma, diversos estudos estão sendo realizados utilizando este resíduo como matéria prima para produção de hidrogênio e metano (FERNÁNDEZ et al., 2015; JO; KIM; LEE, 2016; OTTAVIANO et al., 2017; RAMOS et al., 2020). Segundo Hassan e Nelson (2012), na degradação da lactose, principal carboidrato do soro de queijo, piruvato e NADH são produzidos para posterior conversão a diferentes intermediários, como lactato, formiato, propionato, butirato, etanol, acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, os quais serão convertidos à metano.

O rendimento máximo da fermentação do soro de queijo é de 8 mols de hidrogênio e 4 mols de acetato por mol de lactose, ou 4 mols de hidrogênio e 2 mols de butirato por mol de lactose, a depender da rota seguida pelos microrganismos. Com relação a produção de metano, 6 mols de metano podem ser produzidos para cada mol de lactose consumido. As Equações 7-9 apresentam as três rotas referidas.



### 2.4.1. Produção de hidrogênio

Davila-Vazquez et al. (2009) avaliaram a produção contínua de biohidrogênio a partir de soro de queijo em reator CSTR. A metodologia consistiu na variação do TDH em 10, 6 e 4 h, e após a determinação do melhor TDH (6 h), alterou-se os valores da TCO em 92,4, 115,5, 138,6 e 184,4 g de lactose.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os experimentos ocorreram em condição mesofílica (35°C) e foram controlados para que o pH se conservasse a 5,9. Dessa forma, rendimento de 2,8 mol de H<sub>2</sub>.mol de lactose<sup>-1</sup> e produção volumétrica de 46,61 mmol de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> foram alcançados na TCO de 138,6 g de lactose.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, sendo esta a condição que proporcionou os melhores resultados. Os principais ácidos formados durante a operação foram ácido butírico, propiônico e acético. Os autores verificaram a influência do TDH na manutenção das comunidades microbianas presentes no reator, observando que no TDH de 4 h ocorreu a lavagem das bactérias acidogênicas.

O efeito da temperatura na fermentação de soro de queijo foi estudado por Kargi, Eren e Ozmihci (2012) em reatores batelada. Os experimentos foram realizados a 35°C e 55°C, o pH inicial foi ajustado para 7 e a concentração fixada em 10,77 g de açúcar.L<sup>-1</sup>. A temperatura na faixa termofílica se mostrou mais apropriada para a fermentação do soro de queijo, apresentando os maiores resultados para produção cumulativa de hidrogênio (171 mL), rendimento (0,81 mol de H<sub>2</sub>.mol de glicose<sup>-1</sup>) e produção volumétrica de H<sub>2</sub> (3,46 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) quando comparada a faixa mesofílica (103 mL de H<sub>2</sub>, 0,47 mol de H<sub>2</sub>.mol de glicose<sup>-1</sup> e 2,38 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Perna et al. (2013) avaliaram o efeito de variações na TCO sob a produção de H<sub>2</sub> em reator de leito fixo operando com TDH de 24 h, utilizando soro de queijo como fonte de carbono. As TCO adotadas foram 22, 33 e 37 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. O aumento na TCO se mostrou favorável à produção de hidrogênio, sendo alcançada uma PVH de 1 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e rendimento de 0,668 mol de H<sub>2</sub>.mol de lactose<sup>-1</sup>, com valores máximos de até 1,1 mol de H<sub>2</sub>.mol de lactose<sup>-1</sup>. O pH dos reatores foi ajustado para se manter acima de 5. O principal metabólito foi ácido butírico, no entanto, enquanto o pH não havia sido ajustado para maior do que 5, ácido láctico predominou sobre os outros metabólitos.

Com o objetivo de estudar a influência do TDH e do tipo de inóculo na produção de hidrogênio em um reator RALF mesofílico, Rosa et al. (2014b) utilizaram soro de queijo como substrato. O TDH foi avaliado em 4, 2 e 1 h e as fontes de inóculo analisadas foram lodo de abatedouro de aves e lodo de abatedouro de suínos. A concentração inicial se manteve constante em todos os reatores, sendo igual a 5.000 mgDQO.L<sup>-1</sup>. O TDH de 4h foi o que apresentou melhor rendimento de H<sub>2</sub> (1,33 mol H<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose) e o inóculo que melhor se



adaptou às condições operadas foi o lodo suíno. Ao ser operado no TDH de 1 h, o reator apresentou fração de metano na composição do biogás. Os metabólitos dominantes foram etanol, metanol, ácido acético e ácido butírico.

Lima et al. (2016) aplicaram soro de queijo em reator batelada sequencial (AnSBBR) para investigar como variações na concentração de substrato (3795 a 5671 mg de lactose.L<sup>-1</sup>), tempo de alimentação (10 e 90 min) e na temperatura (15, 30 e 45°C) afetaram a performance do reator. Reciclos do efluente foram realizados a cada 3 h em todos os experimentos. A concentração ótima na faixa estudada foi 4823 mg de lactose.L<sup>-1</sup> obtendo 0,80 mol de H<sub>2</sub>.mol de lactose<sup>-1</sup> e 660 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. A temperatura de 15°C foi a que proporcionou melhores resultados (1,12 mol de H<sub>2</sub>.mol de lactose<sup>-1</sup> e 1.080 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), enquanto a 45°C o processo foi negativamente afetado, não sendo detectada produção de hidrogênio. O tempo de alimentação não interferiu nas respostas estudadas. Os metabólitos presentes em maior proporção em todos os ensaios foram ácido acético e butírico.

A fermentação de soro de queijo para produção de hidrogênio em reator RALF foi estudada por Ramos e Silva (2017a), avaliando o efeito do TDH e da temperatura sobre a produção e rendimento de H<sub>2</sub>. A concentração do afluente foi fixada em 10.000 mg carboidrato.L<sup>-1</sup>, a variação do TDH foi entre 8 e 0,5 h e as temperaturas estudadas foram 55, 65 e 75°C. O acréscimo na temperatura e decréscimo no TDH favoreceram a produção de hidrogênio, sendo observado rendimento máximo de 5,51 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup> a 65°C e TDH de 4 h. Nesta condição, a formação de ácido láctico foi suprimida, e os microrganismos seguiram pela rota do ácido butírico e acético. No entanto, a máxima PVH e conteúdo de hidrogênio no biogás foram observados no TDH de 0,5 h, correspondendo a 5,36 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 55,5%, respectivamente. Ao atingir a temperatura de 75°C, o reator apresentou maior produção de lactato, propionato e metanol, além de baixas produções de hidrogênio, indicando que sob temperaturas hipertermofílicas a atividade das bactérias hydrogenogênicas foi inibida.

Ramos e Silva (2017b) também estudaram a performance de reator EGSB na produção de hidrogênio aplicando fermentação de soro de queijo. Neste trabalho, os autores utilizaram temperatura na faixa mesofílica (30°C) e analisaram como o TDH e a concentração de substrato afetaram o rendimento de H<sub>2</sub> e PVH, assim como a formação e composição dos metabólitos. Semelhante ao que ocorreu no reator RALF, decréscimos no tempo de detenção hidráulica favoreceram o rendimento e produção volumétrica, com valores máximos de 0,86 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e 0,23 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> na concentração de 15 g de lactose.L<sup>-1</sup>, e 0,64 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e 0,31 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> na concentração de 25 g de lactose.L<sup>-1</sup>, sendo

todos esses resultados obtidos no TDH de 4 h. Dessa forma, conclui-se que a menor concentração proporcionou maior rendimento, enquanto a maior concentração forneceu maiores produções de  $H_2$ . Os principais ácidos foram ácido butírico, acético e lático, sendo que a rota do ácido acético e butírico foram preferidas quando decréscimos no TDH e acréscimos na concentração foram realizados.

Ottaviano et al. (2017) estudaram o efeito do TDH e concentração inicial de soro de queijo na produção de hidrogênio em reator RALF termofílico ( $55^\circ C$ ). Em um primeiro reator (AFBR1), o intervalo estudado correspondeu aos TDH de 8 – 0,5 h com concentração fixa de  $4.900 \text{ mg de lactose.L}^{-1}$  e, em um segundo reator (AFBR2) variou-se a concentração de  $2.800$  a  $14.600 \text{ mg de lactose.L}^{-1}$  com TDH fixado em 6 h. Na avaliação do TDH, os valores máximos de PVH e rendimento de hidrogênio ocorreram em diferentes pontos, TDH de 0,5 e 4 h, respectivamente, iguais a  $4,1 \text{ L de } H_2.L^{-1}.h^{-1}$  e  $3,67 \text{ mol de } H_2.mol \text{ de lactose}^{-1}$ . Com relação à concentração,  $6.800 \text{ mg de lactose.L}^{-1}$  forneceu a melhor PVH,  $0,85 \text{ L de } H_2.L^{-1}.h^{-1}$ , enquanto o melhor rendimento de  $2,64 \text{ mol de } H_2.mol \text{ de lactose}^{-1}$  foi observado na concentração de  $2800 \text{ mg de lactose.L}^{-1}$ . Dessa forma, menores concentrações de substrato favoreceram o rendimento de hidrogênio, enquanto maiores concentrações favoreceram a PVH, até a concentração em que o reator passou a ser sobrecarregado. Tanto na investigação da influência do TDH quanto da concentração, os principais metabólitos foram ácido lático e butírico. A rota metabólica foi diretamente influenciada pela TCO, sendo que no AFBR1 a maior TCO produziu um aumento na quantidade de ácido lático, decréscimos no rendimento e maior valor de produção volumétrica de  $H_2$ , e no AFBR2, aumentos na TCO proporcionaram acúmulo de ácido acético.

Como pode ser observado nos trabalhos citados anteriormente, muitos são os fatores que podem influenciar a produção de  $H_2$  obtida por meio da fermentação. Nesse contexto, Asunis et al (2019) avaliaram o tempo de fermentação e o pH na formação de bioquímicos e biocombustíveis a partir de soro de queijo. Os experimentos foram realizados em bateladas a  $39^\circ C$ , variando o pH em 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5. De acordo com os autores, a conversão de carboidrato se mostrou fortemente ligada ao pH reacional, apresentando uma velocidade de degradação aproximadamente 10 vezes maior com a mudança no pH de 5,0 para 7,5. A batelada que apresentou os melhores resultados para rendimento e produção volumétrica de hidrogênio foi a que correspondeu ao pH 6,0, fornecendo  $1,54 \text{ mol de } H_2.mol^{-1}_{lactose}$  e  $5,2 \text{ L de } H_2.L^{-1}$ .

Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) estudaram a produção de hidrogênio utilizando soro de queijo em reator anaeróbio de leito estruturado (ASTBR) sob temperatura de  $25^\circ C$ , TCO de  $24 \text{ kgDQO.m}^{-3}.d^{-1}$  e TDH de 24 h. O rendimento de hidrogênio foi de

1,4 mol de  $H_2 \cdot mol^{-1}_{\text{carboidrato}}$  e a PVH foi de 1,6 L de  $H_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ . Os principais metabólitos foram ácido láctico, acético e butírico. Ao final da operação, a cultura microbiana presente no reator foi utilizada como inóculo para ensaios em batelada, cujo objetivo foi avaliar as transformações metabólicas envolvidas na produção de metano. Assim, os autores verificaram que 1,02 L de hidrogênio produzidos nas primeiras 38,5 h foram obtidos diretamente da lactose, enquanto 2,98 L foram gerados dos metabólitos da fermentação da lactose, ou seja, do consumo simultâneo de acetato e lactato e como subproduto da produção de ácido butírico.

Utilizando reator RALF, Marques et al. (2019) estudaram a produção de hidrogênio por meio da fermentação de soro de queijo em condição mesofílica. Um pré-tratamento térmico foi realizado no inóculo com o objetivo de eliminar os microrganismos consumidores de  $H_2$ . Dessa maneira, TDH entre 0,5 e 6 h foram impostos no reator, resultando em TCO entre 12,34 e 167,02  $kgDQO \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ . O aumento da TCO foi desfavorável para o consumo de carboidratos, reduzindo-o de 81% para 54,4%. No entanto, com o decréscimo do TDH maiores remoções de DQO e PVH foram observadas. No TDH de 0,5 h a PVH foi igual a 1,4 L de  $H_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$  e a remoção de DQO foi 24,5%. Com relação ao rendimento de hidrogênio, o melhor resultado foi de 2,7 mol de  $H_2 \cdot mol^{-1}_{\text{carboidrato}}$ , o qual ocorreu no TDH de 6 h, sendo associado à maior eficiência de degradação de carboidratos. Ácido acético e butírico foram os principais metabólitos produzidos no reator. Destaca-se que a maior concentração de ácido acético foi de 10,28  $mmol \cdot L^{-1}$  e ocorreu no TDH de 6 h, enquanto nas demais fases essa concentração oscilou entre 4,34 e 5,96  $mmol \cdot L^{-1}$ , sendo próxima a concentração de ácido butírico (2,66-5,35  $mmol \cdot L^{-1}$ ).

Na Tabela 1 são apresentados de forma resumida os principais resultados de trabalhos da literatura que estudaram a produção de  $H_2$  por meio da fermentação do soro de queijo. Conforme citado anteriormente, o aumento da concentração de substratos e aplicação de elevadas TCO intensificam a produção e acúmulo de ácidos orgânicos. Analisando os trabalhos apresentados na Tabela 1, verifica-se que a adoção de concentrações de substrato acima de 20  $g \cdot L^{-1}$  de lactose aplicada por Davila-Vazquez et al. (2009) e Romão et al. (2018), proporcionou um elevado rendimento de  $H_2$  em comparação com os demais estudos apontados na Tabela 1. Observa-se que nestes dois trabalhos utilizou-se a temperatura na faixa mesofílica e ocorreu o controle adequado do pH, sendo que Davila-Vazquez et al. (2009) mantiveram o pH em 5,9 e Romão et al. (2018) em 5,5. Conforme demonstrado por Perna et al. (2013), abaixo de pH 5, a rota do ácido láctico é favorecida na fermentação mesofílica. A formação desse ácido pode ser prejudicial à produção de  $H_2$ , pois substrato que deveria ser convertido a  $H_2$  acaba sendo utilizado para produção de ácido láctico. Entretanto, ao observar os trabalhos termofílicos

da Tabela 1, observa-se pH de operação entre 4,0 e 4,5 (OTTAVIANO et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2017a), diferente dos pH aplicados nos estudos mesofílicos. Porém, apesar do pH mais ácido, resultados similares foram observados. Assim como na faixa mesofílica, o desvio das rotas favoráveis à produção de H<sub>2</sub> para produção de ácido lático acaba sendo um dos principais fatores que colaboram para baixos rendimentos de H<sub>2</sub>, sendo este comportamento observado por Ottaviano et al. (2017). Assim, a otimização dessas variáveis se torna um parâmetro importante do processo, pois o aumento da concentração de substrato e TCO pode incrementar o rendimento de hidrogênio, como também pode provocar a excessiva produção e acúmulo de metabólitos como ácido lático, prejudicando a geração de H<sub>2</sub>, seja pela inibição de microrganismos produtores de H<sub>2</sub> ou pela concorrência por substrato (NOIKE, 2002; CASTELLÓ et al., 2020).

Nos demais trabalhos indicados na Tabela 1 verifica-se predomínio da temperatura na faixa mesofílica e rendimentos de H<sub>2</sub> entre 0,5 – 4,0 mol H<sub>2</sub>.(mol lactose)<sup>-1</sup> (KARGI; EREN; OZMIHCI, 2012; ROMÃO et al., 2018). Com relação à produção volumétrica de hidrogênio, observa-se que, com exceção do estudo de Davila-Vazquez et al. (2009), a temperatura na faixa termofílica apresentou resultados superiores à mesofílica. Ao comparar as PVH observadas por Kargi, Eren e Ozmihci (2012) em 35 °C e em 55 °C, comprova-se PVH cerca de 45% maior na temperatura mais elevada.

**Tabela 1** – Produção de H<sub>2</sub> a partir da fermentação do soro de queijo

Reator	Temperatura	Concentração (gDQO.L <sup>-1</sup> )	HY	PVH (L H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Referência
CSTR	37 °C	35	2,8 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub>	28,5 <sup>(a)</sup>	(DAVILA-VAZQUEZ et al., 2009)
batelada	35 °C 55 °C	12,1	0,47 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>glicose</sub> 0,81 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>glicose</sub>	0,06 <sup>(a)</sup> 0,08 <sup>(a)</sup>	(KARGI; EREN; OZMIHCI, 2012)
PBR	30 °C	37	0,668 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub>	1,0	(PERNA et al., 2013)
RALF	30 °C	5	1,0–1,3 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub>	5,5 – 17,8 <sup>(a)</sup>	(ROSA et al., 2014b)
AnSBBR	30 °C	4,07	0,60 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>carboidrato</sub>	0,42	(LIMA et al., 2015)
RALF	55 °C	5,5	3,67 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub>	98,4 <sup>(a)</sup>	(OTTAVIANO et al., 2017)
RALF	55 °C 65 °C	11,2	4,10 mmol H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup> 5,51 mmol H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	128,6 <sup>(a)</sup> 33,1 <sup>(a)</sup>	(RAMOS; SILVA, 2017a)
batelada	30 °C	20	4,04 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub>	3,2 <sup>(a)</sup>	(ROMÃO et al., 2018)
CSTR	30 °C	29	0,9 mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub>	0,8	(CASTELLÓ et al., 2018)

RALF: reator anaeróbico de leito fluidizado; CSTR: reator contínuo de mistura perfeita; PBR: reator de leito fixo empacotado; AnSBBR: reator anaeróbico de batelada sequencial com biomassa imobilizada; HY: rendimento de hidrogênio; PVH: produção volumétrica de hidrogênio; (a) calculado pelo autor

#### 2.4.2. Produção de metano

O estudo da produção de metano a partir do soro de queijo também tem sido explorado na área científica, sendo investigada a produção energética a partir desse substrato via digestão anaeróbica desde a década de 80 (LO; LIAO; CHIU, 1988; YAN; LIAO; LO, 1988).

Fernández et al. (2015) avaliaram a digestão anaeróbica de soro de queijo em reator batelada sequencial (SBR) termofílico (55°C) nos TDH de 25, 16,7, 12,5 e 8,3 d, aumentando

a TCO de 1,5 até 4,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os autores observaram rendimento de 314,5 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> e PVM de 1,4 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no TDH de 8,3 d. Ácido acético e propiônico foram os principais metabólitos acumulados com concentração de 170 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Decréscimos no TDH até 8,3 d demonstraram aumentar o acúmulo de AOV, porém concentrações abaixo dos valores inibitórios foram observados.

Antonelli et al. (2016) avaliaram a produção de biogás por meio da digestão anaeróbia de soro de queijo utilizando água residuária de suinocultura como inóculo. Neste trabalho, os experimentos foram executados em reator batelada e duas temperaturas foram estudadas: 26°C e 32°C. Os rendimentos de metano produzidos foram 168 – 174 L de CH<sub>4</sub>.kgSV<sup>-1</sup> e 99 – 110 L de CH<sub>4</sub>.kgSV<sup>-1</sup> para 32°C e 26°C, respectivamente.

O tratamento de soro de queijo para produção contínua de metano foi estudado por Jo, Kim e Lee (2016) utilizando filtro anaeróbio. A digestão transcorreu a 35°C e TDH fixo de 5 d, variando a concentração em 4, 8, 12, 16 e 20 g.L<sup>-1</sup>, e conseqüentemente a TCO em 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 e 4 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. O reator comportou-se de forma estável no intervalo 0,8 – 2,4 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> sem que houvesse controle do pH, removendo cerca de 80% da DQO. Porém, ao aumentar a TCO, decréscimos na eficiência de remoção e no pH foram observados. O rendimento de metano permaneceu entre 0,28 e 0,34 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, e a produção volumétrica aumentou à medida que acréscimos na TCO foram realizados, atingindo o máximo de 589 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, apesar do conteúdo de metano decrescer de 65,4% para 43,7%. Acetato foi o metabólito dominante em todos os experimentos, sendo que maior acúmulo de ácidos foi observado nas maiores TCO.

Ribera-Pi et al. (2018) utilizaram biorreator com membrana no tratamento de soro de queijo para recuperação energética. TDH médio de 15 d foi aplicado ao processo com TCO de 1,2 – 8,4 kgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. O pH foi mantido em 7 por meio da adição de NaOH e a temperatura do processo foi 35°C. O soro de queijo utilizado foi armazenado em temperatura ambiente. A digestão do soro atingiu remoção média de DQO de 91% com produção de biogás de 0,2 a 0,9 m<sup>3</sup> de biogás.kgDQO<sup>-1</sup><sub>rem</sub> e conteúdo de metano de 51 – 73%. Dessa maneira, os autores concluíram que a digestão anaeróbia do soro de queijo pode ser realizada com afluente a temperatura ambiente sem ser necessário a sua refrigeração ou tratamento imediato após sua geração.

Analisando a produção de metano a partir do soro de queijo produzido em quatro indústrias diferentes, Escalante et al. (2018) aplicaram reatores bateladas a 37°C e utilizaram como inóculo estrume de boi. A concentração de matéria orgânica variou de 65 a

140 gDQO.L<sup>-1</sup>. Em todos os experimentos a remoção de DQO foi acima de 83% e rendimentos de metano de 0,51 a 0,60 L CH<sub>4</sub>.gSV<sup>-1</sup><sub>apli</sub> foram alcançados.

Treu et al. (2019) também estudaram a produção de metano a partir de soro de queijo por meio de digestão anaeróbia. A influência da temperatura foi avaliada realizando experimentos a 37°C e 54°C em reatores de mistura perfeita (CSTR). Diferentes condições operacionais foram aplicadas nos dois reatores. Dessa forma, o reator mesofílico foi operado em TDH de 25 d e TCO de 2,2 gSV.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, já o reator termofílico foi avaliado em TDH de 15 d e inicialmente TCO de 3,6 gSV.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. No entanto, como o reator termofílico apresentou instabilidades na TCO empregada devido à sobrecarga e capacidade limitada de tamponamento, um decréscimo na TCO para 2,2 gSV.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi realizado. A condição mesofílica se mostrou mais adequada para a digestão do soro, enquanto a termofílica forneceu uma acidificação do meio.

Cruz-Salomón et al. (2020) estudaram o tratamento de água residuária de soro de queijo em reator de leito granular expandido (EGSB) e aplicaram TDH de 6 d (TCO 7,76 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e 8 d (TCO 5,74 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Remoções de DQO acima de 90% foram observadas, e os rendimentos e produções volumétricas de metano foram 334 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e 2,327 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para o TDH de 6 d e 328 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e 1,758 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para o TDH de 8 d.

Trabalhos da literatura que avaliaram a digestão anaeróbia do soro de queijo são exibidos na Tabela 2. Assim como foi observado no processo de fermentação, a digestão do soro de queijo é, na maioria das vezes, estudada na faixa mesofílica. Conforme apontado por Treu et al. (2019), a temperatura na faixa termofílica proporcionou PVM aproximadamente 2,8 vezes superior a PVM da temperatura de 37°C, apesar da condição termofílica ter exibido maiores instabilidades ocasionadas pelo acúmulo de ácidos orgânicos. Analisando a Tabela 2 verifica-se que altas concentrações de matéria orgânica são utilizadas na digestão anaeróbia, porém elevados TDH são empregados, geralmente superiores a 5 d (FERNÁNDEZ et al., 2015; JO; KIM; LEE, 2016; TREU et al., 2019; CRUZ-SALOMÓN et al., 2020). Assim, evidencia-se o uso de baixas TCO quando este substrato é utilizado, sendo as menores TCO preferidas para evitar possíveis problemas de acidificação e falhas no reator.

**Tabela 2** – Produção de CH<sub>4</sub> a partir da digestão anaeróbia do soro de queijo

Reator	Temperatura	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	MY	PVM (L CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Autor
SBR	55 °C	38,2 (DQO)	0,36 L de CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	1,4	(FERNÁNDEZ et al., 2015)
DanF	35 °C	4 – 20 (DQO)	0,28 – 0,34 L de CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	0,18 – 0,60	(JO; KIM; LEE, 2016)
batelada	26 °C 32 °C	59,22 (sólidos totais)	99 – 110 L de CH <sub>4</sub> .kgSV <sup>-1</sup> 168 – 174 L de CH <sub>4</sub> .kgSV <sup>-1</sup>	-	(ANTONELLI et al., 2016)
batelada	37 °C	65 – 140 (DQO)	0,51 – 0,60 L CH <sub>4</sub> .gSV <sup>-1</sup>	-	(ESCALANTE et al., 2018)
CSTR	37 °C 54 °C	55 (VS) 33 (VS)	-	0,5 1,4	(TREU et al., 2019)
EGSB	26,6 °C	46,6 (DQO)	0,33 L de CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	2,3	(CRUZ-SALOMÓN et al., 2020)

SBR: reator batelada sequencial; DanF: filtro anaeróbio de fluxo descendente; CSTR: reator contínuo de mistura perfeita; EGSB: reator de leito granular expandido; MY: rendimento de metano; PVM: produção volumétrica de metano

## 2.5. Glicerol: Produção mesofílica e termofílica de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>

O biodiesel é um combustível proveniente da transesterificação de triglicerídeos na presença de um catalisador ácido, básico ou enzimático, sendo composto por monoalquilésteres de ácidos graxos (GARCIA, 2006). Juntamente com a formação desta substância tem-se a produção de glicerol, principal subproduto da reação mencionada. A reação de transesterificação é exemplificada na Figura 5.

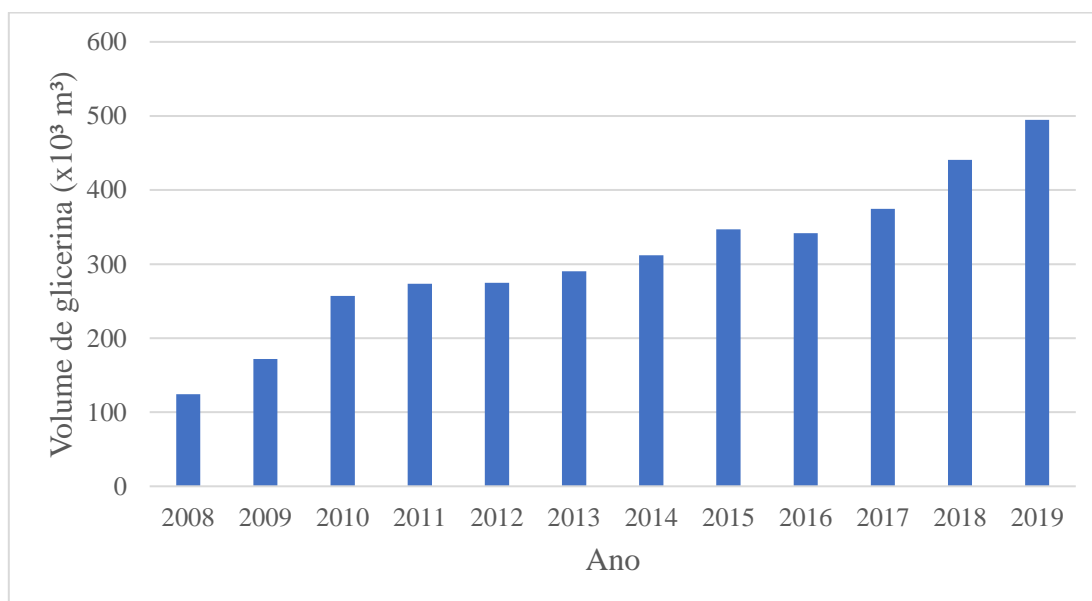
**Figura 5** – Reação de transesterificação. Fonte: (GARCIA, 2006)



Com elevado potencial energético, o biodiesel tem sido implantado como substituto do diesel, combustível derivado do petróleo, em consequência do seu caráter renovável, já que para sua fabricação óleos de origem vegetal ou animal podem ser utilizados.

No intuito de promover a produção e consolidação deste combustível no país, em 2005 implantou-se no Brasil a Lei nº 11.097/2005, que tornou obrigatório a adição de biodiesel no diesel comercializado. Em 2008, ano em que essa norma passou a vigorar, esse percentual era de 2%. Com o decorrer dos anos, esse número foi sucessivamente ampliado, e atualmente, esse valor está em 13% (ANP, 2021).

Em 2019, segundo a ANP, a produção nacional de biodiesel foi de aproximadamente 5,9 bilhões de litros e a geração de glicerina foi de mais de 494,6 milhões de litros. As principais regiões produtoras deste biocombustível são a região Centro-Oeste e Sul, e os estados que lideram o ranking nacional são o Rio Grande do Sul e o Mato Grosso. A Figura 6 mostra a evolução da produção deste subproduto nos últimos anos no Brasil. No ano de 2019 a produção de glicerina cresceu cerca de 12,3% em relação ao ano de 2018. Como principal subproduto da fabricação de biodiesel, presume-se que este valor tenda a aumentar cada vez mais, já que a demanda por combustíveis renováveis apresenta um perfil crescente.



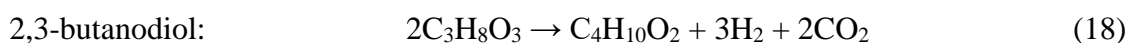
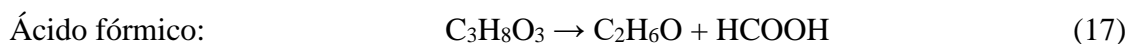
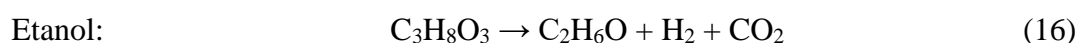
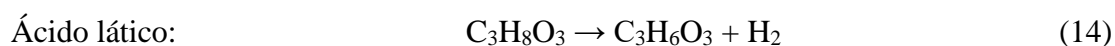
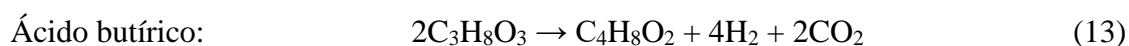
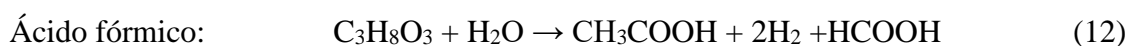
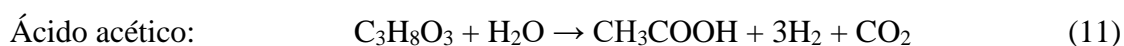
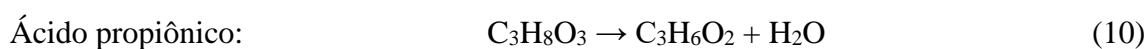
**Figura 6** – Produção de glicerina no Brasil entre 2008 e 2019. Fonte: ANP

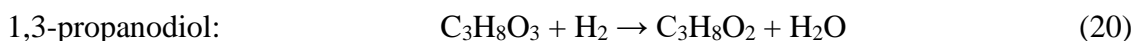
Estima-se que para cada 100 kg de biodiesel produzido, cerca de 10 kg de glicerol bruto são gerados, com 50 a 55% de pureza (TAN; ABDUL AZIZ; AROUA, 2013). Devido às impurezas presentes no glicerol, como metanol, sais, sabão, óleos, dentre outros, este subproduto não pode ser aplicado diretamente nos setores consumidores de glicerina, tais como

farmacêutico, cosmético e alimentício. Para tal, faz-se necessário um processo prévio de purificação, tornando sua aplicação dispendiosa (SARMA et al., 2012).

Apesar do glicerol ser empregado em diferentes setores, o volume gerado deste subproduto da indústria do biodiesel tem sido capaz de suprir a sua demanda e ainda se verifica um excedente (ROSLAN et al., 2020). Em razão da grande quantidade de glicerol disponível, seu preço no mercado decaiu significativamente (MONTEIRO et al., 2018), ocasionando desinteressante por este produto excedente do ponto de vista comercial. Dessa forma, esse glicerol acaba se tornando um resíduo do processo, o qual deve ser tratado antes de seu descarte em razão do elevado nível poluidor que possui. De acordo com Chen, Yin e Wang (2021), uma variedade de microrganismos é capaz de utilizar o glicerol como fonte de carbono e crescer anaerobicamente, possibilitando o reaproveitamento deste material para produção de biocombustíveis e outros compostos de valor agregado. Assim, com a crescente demanda pela inserção de fontes renováveis no cenário energético atual, diversas pesquisas voltadas para produção de hidrogênio e metano utilizando glicerol estão sendo desenvolvidas.

Nas Equações 10 a 21 são apresentadas as principais reações que ocorrem na digestão anaeróbia do glicerol, destacando os principais produtos e subprodutos formados. Segundo Biebl et al. (1999), a degradação do glicerol pode ocorrer pela via metabólica oxidativa ou pela via metabólica redutiva. Na via oxidativa, piruvato é metabolizado e posteriormente consumido para produção de metabólitos como acetato, butirato, lactato, etanol, butanol, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, assim como na degradação de carboidratos, e succinato também pode ser gerado, formando como produto propionato (Equações de 10 a 19). Pela via redutiva ocorre a desidratação do glicerol, sendo posteriormente convertido a 3-hidroxiacetaldeído, o qual é reduzido à 1,3-propanodiol (20).





Analisando as equações 10 a 21, verifica-se que a produção máxima de hidrogênio é de 3 mol para cada mol de glicerol consumido e que a produção de metano é de 1,75 mol de CH<sub>4</sub> por mol de glicerol.

### 2.5.1. Produção de hidrogênio

Reungsang; Sittijunda e O-Thong (2013) estudaram a fermentação de glicerol para produção de biohidrogênio utilizando bactérias *Enterobacter aerogenes* imobilizadas em reator UASB. Todo o processo ocorreu a 37°C e o pH foi ajustado para 5,5 continuamente durante a operação. Com o propósito de otimizar a produção de H<sub>2</sub>, diferentes TCO foram aplicadas, variando entre 25 e 75 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. A TCO que apresentou maior conteúdo de hidrogênio no biogás e máxima PVH foi 50 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, com os seguintes resultados para glicerol puro e glicerol residual: 37,1% e 24,2%, e 9 mmol de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 6,2 mmol de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Etanol, 1,3-propanodiol, ácido fórmico e acético foram os metabólitos dominantes.

O estudo da produção de hidrogênio em reator RALF utilizando glicerol bruto como substrato em condições termofílica foi realizado por Ferreira (2014). A autora avaliou o TDH, variando-o de 14 a 1 h. O maior rendimento (3 mol de H<sub>2</sub>.mol de glicerol<sup>-1</sup>), produção volumétrica (1508,7 mL.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>) e percentual de H<sub>2</sub> no biogás (70%) foram obtidos no TDH de 1 h. Ácido propiônico, ácido acético e 1,3-propanodiol foram os principais metabólitos observados na condição cujo rendimento e produção volumétrica de H<sub>2</sub> atingiram seu valor máximo.

A produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto foi avaliada por Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) em reator de fluxo ascendente sob condição mesofílica (35°C), utilizando esferas de cerâmica como material suporte. Os parâmetros analisados neste trabalho foram concentração de glicerol bruto (10, 15, 20 e 25 gDQO.L<sup>-1</sup>), pH (6, 6,5 e 7) e TDH (24, 36 e 48 h). No que diz respeito ao rendimento de hidrogênio, verificou-se que o pH afluente influenciou nos resultados de forma significativa, promovendo acréscimos de até 67% no rendimento ao elevar em 1 unidade o pH. Observou-se que aumentos nas concentrações de substrato e decréscimos no TDH proporcionaram maiores rendimentos, sendo os melhores resultados de produção volumétrica observados nas maiores TCO. O valor máximo de

$107,3 \pm 0,7$  L de  $H_2$ .kg de glicerol<sup>-1</sup> foi alcançado na TCO  $29,7$  gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (valor experimental), a qual correspondeu a concentração de  $25$  gDQO.L<sup>-1</sup> e TDH de 24 h, conduzido no pH 7. O principal metabólito obtido em todos os ensaios foi 1,3-propanodiol.

Faber e Ferreira-Leitão (2016) otimizaram os parâmetros pH, concentração de glicerina e sólidos suspensos voláteis (SSV) na fermentação de glicerina residual para produção de hidrogênio. O pH do meio foi ajustado para 7 e os ensaios em batelada transcorreram a 35°C com inóculo de lodo anaeróbico. Os intervalos estudados das variáveis foram: pH de 4,8 a 8,2, concentração de  $0,5$  a  $1,5$  g.L<sup>-1</sup> e SSV de  $3,3$  a  $11,7$  g.L<sup>-1</sup>. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinação do ponto de ótimo, o qual correspondeu a pH 5,5, concentração de glicerina  $0,5$  g.L<sup>-1</sup> e SSV  $8,7$  g.L<sup>-1</sup>, resultando em  $2,44$  mol de  $H_2$ .mol de glicerina<sup>-1</sup>. Esse resultado foi bem próximo ao valor previsto pelo modelo ajustado pelos autores.

Rodrigues et al. (2016) avaliaram o glicerol oriundo da transesterificação de óleos de cozinha usados para produção de hidrogênio em reator batelada. Tratamento ácido foi aplicado no glicerol bruto afim de retirar impurezas inibitórias. O inóculo sofreu pré-tratamento térmico para inativação das *archaeas* metanogênicas. O experimento analisou um reator composto por 80% de glicerol e 20% glicerina pura, e um outro reator preenchido com 100% de glicerol bruto. O autor verificou que a produção de hidrogênio foi menor com o aumento do glicerol bruto, relacionando este fato ao nível de impurezas que aumentaram com o acréscimo do substrato. Assim, o rendimento máximo de hidrogênio obtido foi de  $1,63$  mol  $H_2$ .mol de glicerol<sup>-1</sup>.

A aplicação de monocultura (*Escherichia coli*) na geração de  $H_2$  por meio da fermentação de glicerol bruto foi investigada por Cofré et al. (2016) em reator batelada e reator batelada alimentada. Neste trabalho, nenhum nutriente adicional foi inserido às bateladas, e as concentrações avaliadas foram  $12,6$ ,  $37,7$  e  $62,8$  g.L<sup>-1</sup>, sendo alimentadas em regime constante e exponencial, e conduzidas a 37°C e pH entre 6,30 e 6,35. O rendimento máximo obtido foi  $0,56$  mol de  $H_2$ .mol de glicerol<sup>-1</sup> alimentado, o qual ocorreu na concentração de  $37,7$  g.L<sup>-1</sup> na estratégia de regime de alimentação exponencial, consumindo 100% do glicerol alimentado.

Zahedi et al. (2016) analisaram o efeito da adição de glicerol a resíduos sólidos municipais para produção de hidrogênio sob condição termofílica em reator batelada. A concentração neste procedimento foi expressa em termos de volume de inóculo, 40% v/v de inóculo, sendo utilizado frascos de 1 L e inseridos 351 g de resíduo municipal, fornecendo  $57$  gDQO.L<sup>-1</sup>. A adição de glicerol foi de 1% v/v, o que possibilitou aproximadamente o dobro da produção de hidrogênio ao comparar os resultados observados sem o glicerol. Sendo assim,

2,32 L de  $H_2.L^{-1}$  foram produzidos, observando-se também aumento no rendimento da hidrólise e da atividade microbiana. Ácido butírico foi o metabólito predominante tanto na operação com glicerol quanto na fermentação do resíduo sólido puro.

A influência da TCO foi avaliada por Sittijunda e Reungsang (2017) na fermentação de glicerol para produção de hidrogênio, etanol e 1,3-propanodiol. Reator UASB mesofílico (37°C) foi inoculado com cultura mista e ajustado para pH 5,5. As TCO testadas durante o experimento foram: 25, 37,5, 50 e 62,5  $g.L^{-1}.d^{-1}$ . Mudanças na TCO afetaram significativamente a performance do reator. Dessa maneira, a TCO ótima para produção de hidrogênio e etanol foi 50  $g.L^{-1}$ , enquanto para obtenção de 1,3-propanodiol foi 62,5  $g.L^{-1}$ . Inicialmente, glicerol puro foi utilizado nos experimentos e, após a determinação da TCO ótima, glicerol bruto passou a ser introduzido ao reator na concentração de 25  $g.L^{-1}$ . Todavia, a TCO ótima utilizando glicerol bruto foi a mesma obtida com glicerol puro. Assim, os maiores rendimentos para hidrogênio, etanol e 1,3-propanodiol usando glicerol puro foram 579,8  $mmol H_2.mol glicerol^{-1}$ , 0,3  $mol.mol glicerol^{-1}$  e 0,2  $mol.mol glicerol^{-1}$ , respectivamente, enquanto com glicerol bruto foram 368,1  $mmol H_2.mol glicerol^{-1}$ , 0,4  $mol.mol glicerol^{-1}$  e 0,3  $mol.mol glicerol^{-1}$ . Além dos produtos almejados neste estudo, ácido butírico, propiônico, acético, fórmico, láctico e butanol foram observados.

Poladyan, Baghdasaryan e Trchounian (2018) analisaram a produção de  $H_2$  gerada da fermentação de xilose e glicerol puros e da co-digestão dos dois substratos em dois valores de pH: 5,5 e 7,5. Neste trabalho, a formação de  $H_2$  foi estudada por um tipo selvagem de *Escherichia coli* e células mutantes de hidrogenase em alta e baixa capacidade de tamponamento por peptona. Os autores verificaram maiores rendimentos utilizando alta capacidade de tamponamento e pH 7,5, observando 1,40  $mmol$  de  $H_2.L^{-1}$  para glicerol, 0,70  $mmol$  de  $H_2.L^{-1}$  para xilose e 2,2  $mmol$  de  $H_2.L^{-1}$  para co-digestão glicerol+xilose. No pH de 5,5 rendimentos de 0,8  $mmol$  de  $H_2.L^{-1}$  e 0,5  $mmol$  de  $H_2.L^{-1}$  foram verificados para o glicerol e a co-digestão, respectivamente, não sendo produzido  $H_2$  na fermentação da xilose. Na baixa capacidade de tamponamento uma elevada variação do pH foi observada, e somente o glicerol produziu hidrogênio, resultando em 0,8  $mmol.L^{-1}$  e 1,2  $mmol.L^{-1}$  para pH 5,5 e 7,5.

A bioconversão de glicerol bruto oriundo de óleo de cozinha em  $H_2$  foi estudada por Rodrigues et al. (2019) utilizando cultura mista (reator 1) e cultura pura (*Enterobacter sp.*) (reator 2) em reator batelada a 37°C. As bateladas se iniciaram com concentração de 20  $gDQO.L^{-1}$ , sendo o pH inicial para fermentação com cultura mista ajustado para 5,5, enquanto o pH no reator com cultura pura foi 7. Devido aos contaminantes presentes no glicerol bruto, o experimento contendo cultura pura apresentou resultados inferiores quando comparado

a cultura mista. A *Enterobacter* sp. seguiu pela rota redutiva, gerando 1,3-propanodiol e, conseqüentemente, menores rendimentos de hidrogênio. Já a cultura mista seguiu a rota oxidativa para produção de H<sub>2</sub>. Assim, o consumo de glicerol no reator 1 foi 56,2%, com rendimento de 0,8 mol de H<sub>2</sub>.mol de glicerol<sup>-1</sup>, à medida que, no reator 2, 88% do glicerol foi degradado gerando rendimento de 0,13 mol de H<sub>2</sub>.mol de glicerol<sup>-1</sup> e 1460 mg.L<sup>-1</sup> de 1,3-propanodiol.

Silva et al. (2020) utilizaram glicerol bruto para avaliar a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis em um reator semi-contínuo sob condição mesofílica (35°C) e TDH de 24 h. Duas concentrações de glicerol foram utilizadas: 10 e 50 g.L<sup>-1</sup>. O reator com concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> foi o que apresentou melhor desempenho em todos os parâmetros analisados na produção de H<sub>2</sub>. O rendimento e produção volumétrica de H<sub>2</sub> no reator com 10 g.L<sup>-1</sup> foi 0,25 mol de H<sub>2</sub>.mol<sub>glicerol</sub><sup>-1</sup> e 350 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. Já o reator com 50 g.L<sup>-1</sup> forneceu apenas 0,01 mol de H<sub>2</sub>.mol<sub>glicerol</sub><sup>-1</sup> e 130 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, indicando que a elevada concentração imposta favoreceu a produção de outros intermediários ao invés de promover a produção de H<sub>2</sub> e ácidos orgânicos voláteis. Os autores associaram a baixa produção nos reatores ao fato do TDH utilizado não ter sido suficiente para a utilização adequada do substrato. Além disso, as impurezas presentes no glicerol bruto podem ter colaborado para o baixo rendimento. Ácido acético e butírico foram os metabólitos predominantes durante a operação, com exceção dos últimos dias no qual ácido propiônico passou a compor uma alta proporção na distribuição de ácidos.

A avaliação do emprego de reator RALF na fermentação de glicerol bruto foi feita por Simões et al. (2021) aplicando concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>, TDH entre 1-8 h e temperatura de 55°C e 30°C. O reator termofílico apresentou melhor desempenho, exibindo rendimento de hidrogênio de 1,2 mol H<sub>2</sub>.(mol glicerol<sub>consumido</sub>)<sup>-1</sup> e PVH de 23,3 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no TDH de 1 h. O reator mesofílico não apresentou rendimento de hidrogênio no intervalo de TDH avaliado, sendo tal fato associado ao desvio da rota para produção de 1,3-propanodiol e ácido capróico.

A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos da literatura que realizaram a fermentação do glicerol para produção de H<sub>2</sub>. Analisando os trabalhos que compõem a Tabela 3, observa-se que a fermentação de glicerol é mais estudada em condição mesofílica do que em condição termofílica. Entretanto, comparando o desempenho de reatores termofílicos (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020; SIMÕES et al., 2021) e reatores mesofílicos (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017; SIMÕES et al., 2021), atesta-se que a condição termofílica é mais favorável à produção de H<sub>2</sub>. Além disso, observa-se que a condição termofílica suporta a aplicação de maiores TCO, como pode ser atestado ao comparar a TCO ótima determinada em

Sittijunda e Reungsang (2020) (55 °C) (62,5 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) com a TCO ótima de Sittijunda e Reungsang (2017) (37 °C) (50 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Verifica-se que a concentração de glicerol aplicada é um dos fatores que mais impacta o processo, e que influencia nas rotas seguidas e rendimento de H<sub>2</sub>. Observa-se na Tabela 3 que as concentrações de glicerol mais elevadas, acima de 20 g.L<sup>-1</sup> (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012b, 2017; REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013; MARU et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019), com exceção de Sittijunda e Reungsang (2020), forneceram rendimentos menores (máximo de 1,0 mol H<sub>2</sub>.mol glicerol<sup>-1</sup>) do que os rendimentos apresentados nos trabalhos cuja concentração de glicerol foi mais baixa, inferior a 10 g.L<sup>-1</sup> (FERREIRA, 2014; RODRIGUES et al., 2016; SIMÕES et al., 2021).

**Tabela 3** – Produção de H<sub>2</sub> a partir da fermentação do glicerol

Reator	Temperatura	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	HY (mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> glicerol)	PVH (L H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Referência
batelada	35 °C	20,33	0,3	0,409	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012b)
UASB	37 °C	25	0,41	5,5 <sup>(a)</sup>	(REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013)
RALF	55 °C	5	3,0	36 <sup>(a)</sup>	(FERREIRA, 2014)
batelada	37 °C	1-3%	0,646	-	(KUMAR et al., 2015)
batelada	37 °C	20	1,0	-	(MARU et al., 2016)
batelada	37 °C	10	2,2	-	(RODRIGUES et al., 2016)
UASB	37 °C	25	0,5798	3,7 <sup>(a)</sup>	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017)
batelada	37 °C	20	0,8	-	(RODRIGUES et al., 2019)
UASB	55 °C	25	2,9	-	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020)
RALF	30 °C 55 °C	10	- 1,2	0,51 23,3	(SIMÕES et al., 2021)

UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; RALF: reator anaeróbio de leito fluidizado; HY: rendimento de hidrogênio; PVH: produção volumétrica de hidrogênio; <sup>(a)</sup>: calculado pelo autor

### 2.5.2. Produção de metano

O efeito da taxa de carregamento orgânico em reator AnSBBR foi avaliada por Bezerra et al. (2011) tratando efluente da produção de biodiesel. Os autores empregaram temperatura na faixa mesofílica e concentrações de substratos de 1,0 – 4,0 gDQO.L<sup>-1</sup>, variando a TCO entre 1,5 e 6,0 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. O aumento da TCO promoveu acréscimos na quantidade acumulada de AOV, aumentando de 42 mgHAc.L<sup>-1</sup> na TCO de 1,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 729 mgHAc.L<sup>-1</sup> na TCO de 6,0 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. O rendimento de metano também apresentou incrementos até a TCO de 4,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, na qual 55,5 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> foram produzidos. Com o contínuo acréscimo para 6,0 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> o rendimento decaiu para 36,0 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. Com o objetivo de manter o pH próximo ao neutro foi adicionado bicarbonato de sódio na razão 0,5 – 1,3 gNaHCO<sub>3</sub>.gDQO<sup>-1</sup>alimentada.

O emprego de glicerol para produção de metano também foi estudado por Nuchdang e Phalakornkule (2012), avaliando a digestão desse substrato puro e a sua co-digestão com estrume de porco. O glicerol utilizado neste trabalho foi formado da transesterificação de óleos de cozinha e, portanto, contém grande porção de contaminantes como óleos e gorduras. Devido a estes contaminantes, o glicerol foi pré-tratado com ácido sulfúrico. Taxas de carregamento entre 1,3 e 2,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram empregadas para a digestão do glicerol, no qual a TCO de 1,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> forneceu o máximo rendimento de 0,32 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>rem. Na co-digestão de glicerol com estrume suíno uma razão de DQO de 80:20 (glicerol:estrume) foi aplicada, obtendo resultados satisfatórios entre TCO 1,3 e 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> com maior rendimento de 0,24 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>rem na TCO 1,3 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Vlassis et al. (2013) compararam a produção de metano resultante da digestão anaeróbia de glicerol puro em reator CSTR e reator compartimentado periódico (Periodic Anaerobic Baffled Reactor – PABR). Temperatura na faixa mesofílica (35°C) foi empregada nos experimentos e diferentes TCO foram testadas. Lodo anaeróbio mesofílico foi utilizado nos dois reatores. O reator CSTR foi submetido as TCO 0,25, 0,375 e 0,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, apresentando máxima produção de metano 0,074 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> na TCO de 0,25 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. No PABR a TCO iniciou em 1 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> sendo aumentada para 1,5, 2 e 2,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Nestas condições, o PABR atuou de forma estável, com degradações de DQO acima de 98%. Ao elevar a TCO para 3,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, acúmulo de AOV (principalmente ácido propiônico) foi detectado no reator, culminando na queda do pH para 5,2. Depois de um período de recuperação, o reator foi submetido a TCO de 3 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a qual possibilitou a máxima produção de 0,993 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, com remoção de 95% da DQO. Assim, os autores concluíram que o reator PABR apresentou melhor performance no



tratamento de glicerol e produção de metano, já que maiores cargas puderam ser utilizadas fornecendo elevadas produções de  $\text{CH}_4$  em comparação com o CSTR.

Albuquerque (2014) avaliou a produção de metano em reator UASB utilizando glicerol bruto e glicerina. O estudo investigou o efeito da temperatura ( $35^\circ\text{C}$  e temperatura ambiente), do substrato aplicado (glicerol bruto e glicerina), e da TCO ( $1$  e  $2 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). Os autores verificaram que o tipo de substrato e temperatura aplicada não afetaram os resultados do processo. O aumento da TCO promoveu acúmulo de ácidos orgânicos, indicando que a aplicação de concentrações mais elevadas de substratos resultou em concentrações mais elevadas de produtos da fermentação. Com relação à produção diária de metano, a produção máxima foi de  $0,61 \text{ mL.d}^{-1}$  na TCO de  $2 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Os autores sugeriram que a produção de metano na TCO mais baixa foi subestimada.

A temperatura aplicada no processo é um parâmetro que pode afetar o rendimento e produção de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ . De acordo com Ghimire et al. (2015), a razão da dependência da temperatura se deve a forma como ela afeta a hidrólise dos substratos. Biomassas necessitam de temperaturas mais elevadas devido ao seu conteúdo lignocelulósico, enquanto materiais mais biodegradáveis preferem condições mesofílicas. O autor então destaca que a diferença na temperatura ótima é consequência da porção de biodegradáveis presentes no substrato e do inóculo utilizado no processo. Silvestre et al (2015) avaliaram o efeito da adição de glicerina bruta à digestão anaeróbia de lodo de esgoto em reator CSTR sob diferentes temperaturas. Na condição termofílica os autores relataram instabilidades no processo devido ao pH da glicerina e a sua rápida liberação de ácidos, não sendo a alcalinidade do lodo capaz de controlar a queda do pH. Entretanto, PVM entre  $0,23 - 0,53 \text{ L CH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  foram observadas. Já o processo mesofílico se manteve estável, apresentando aumento de 148% na produção de metano quando a proporção de glicerina no afluente foi equivalente a 1,2% v/v, produzindo  $0,62 \text{ L CH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ .

Ferreira, Volschan Jr e Cammarota (2018a) utilizaram a co-digestão de lodo de esgoto com glicerol para produção de metano em reator batelada, realizando o processo com diferentes proporções de glicerol pré-tratado ou glicerol bruto. Na primeira etapa do estudo, grandes volumes de glicerol bruto e puro ( $5 - 20\% \text{ v/v}$ ) foram inseridos nas bateladas, o que acarretou acúmulo de ácidos nos reatores causando queda acentuada do pH e a inibição da produção de metano. Posteriormente, um volume menor de glicerol bruto, pré-tratado ou puro, equivalente a  $1\% \text{ v/v}$ , foi analisado com objetivo de verificar a influência de impurezas, resultando também em acúmulos de ácidos voláteis e baixa produção de metano. No entanto, os autores associaram as baixas produções a metanogênese e não a salinidade do glicerol. Na terceira etapa,  $0,3$ ,  $0,5$  e  $0,7\% \text{ v/v}$  de glicerol bruto foram utilizados e os reatores apresentaram tamponamento do

meio reacional e maiores produções de metano. A melhor condição para obtenção de metano foi adição de 0,5% v/v de glicerol bruto resultando em 84% de conteúdo de metano no biogás e 413,7 mL de  $\text{CH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1}_{\text{rem}}$ .

Com o objetivo de aumentar a produção de metano obtido na digestão anaeróbia do glicerol bruto, Paulista et al. (2020) estudaram a aplicação de tratamentos prévios no substrato a fim de promover a hidrólise e degradação de ácidos de cadeia longa presentes no glicerol bruto, os quais tendem a inibir a ação das *archaeas* metanogênicas. Para tal, o substrato foi submetido a ultrassom e aos microrganismos *Aspergillus niger* e *Escherichia coli*. No sistema em batelada, o ultrassom se mostrou ineficiente para elevadas concentrações de glicerol (1,7 e 3,2% v/v), enquanto para a concentração de 0,2 % v/v ocorreu um aumento de cerca de 11% na produção de metano. Porém, *A. niger* apresentou acréscimos de 99% no rendimento de metano em relação ao experimento controle quando aplicada a concentração de 1,7% v/v. Ao aumentar a concentração para 3,2% o mesmo comportamento não foi observado, ocorrendo uma diminuição no rendimento. O pré-tratamento com *E. coli* não apresentou incrementos na produção de  $\text{CH}_4$ . Após a determinação das melhores condições de produção de  $\text{CH}_4$  nos experimentos em batelada, os autores utilizaram reator UASB para o estudo em operação contínua. Aplicando pré-tratamento com ultrassom, concentração de 0,2% v/v de glicerol e TCO de  $0,4 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , rendimento de  $0,547 \text{ m}^3$  de  $\text{CH}_4 \cdot \text{kgDQO}^{-1}$  foi observado (aumento de 29% em relação ao reator controle). Com a utilização de *A. niger*, 1,7% v/v de glicerol e TCO de  $2,9 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , o reator produziu  $0,434 \text{ m}^3$  de  $\text{CH}_4 \cdot \text{kgDQO}^{-1}$  (aumento de 77%).

Reator RALF foi adotado por Costa et al. (2021) para a produção de metano utilizando cultura mista de microrganismos. O substrato empregado foi o glicerol bruto. Como estratégia de estudo, os autores avaliaram o efeito da temperatura ( $55^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$ ) e da TCO (1,2 a  $7,6 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) no desempenho do processo. O RALF termofílico exibiu melhores resultados do que o RALF mesofílico, produzindo rendimento de  $330,8 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$  na TCO de  $3,53 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e PVM de  $2,04 \text{ L CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  na TCO de  $7,6 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . O máximo rendimento e PVM do reator mesofílico foi  $266,6 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$  e  $0,9 \text{ L CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente. Os autores associaram o desempenho inferior do RALF mesofílico ao acúmulo de ácidos orgânicos, especialmente ácido acético e ácido propiônico.

A Tabela 4 contém alguns trabalhos da literatura que utilizaram glicerol para produção de metano por meio da digestão anaeróbia. Assim como observado nos estudos de fermentação, verifica-se que a digestão anaeróbia mesofílica é mais explorada na literatura do que a termofílica. No entanto, elevados rendimentos podem ser observados nos reatores termofílicos devido às maiores taxas de reação ocasionadas em altas temperaturas (COSTA et al., 2021).

Analisando os trabalhos da Tabela 4, verifica-se que a adoção de concentrações e TCO mais elevadas de glicerol leva a acúmulos de ácidos orgânicos, principalmente ácido propiônico (VLASSIS et al., 2013), prejudicando a produção de metano. Com exceção dos trabalhos de López et al. (2009) e Vlassis et al. (2013), a concentração de substrato aplicada não ultrapassou 10 g.L<sup>-1</sup>. No entanto, cabe ressaltar que Vlassis et al. (2013) aplicaram TDH de 10 d, e assim, baixas taxas de carregamento orgânico foram inseridos. Conforme apresentado anteriormente, em RALF termofílico, Costa et al. (2021) estabeleceram favorecimento da produção de metano até a TCO de 3,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

**Tabela 4** – Produção de CH<sub>4</sub> a partir da digestão anaeróbia do glicerol

Reator	Temperatura	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	MY	PVM (L CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Autor
batelada	37 °C	81,6 – 85,7	0,356 L CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	-	(LÓPEZ et al., 2009)
ASBR	30 °C	0,5	0,096 L CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	-	(SELMA et al., 2010)
AnSBBR	30 °C	3,0	0,056 L CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	-	(BEZERRA et al., 2011)
UASB	-	4,5 – 5,5	0,32 L CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	-	(NUCHDAN G; PHALAKOR NKULE, 2012)
PABR	35 °C	10 – 37,5	0,33 L CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	0,993	(VLASSIS et al., 2013)
CSTR	70 °C	5	0,74–0,80 mol CH <sub>4</sub> .mol <sup>-1</sup> <sub>glicerol</sub>	-	(ZHANG et al., 2015)
batelada	39 °C	10	-	0,55	(VÁSQUEZ; NAKASAKI, 2018)
RALF	55 °C	1 – 7	0,33 L CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	2,04	(COSTA et al., 2021)

ASBR: reator anaeróbio batelada sequencial; AnSBBR: reator anaeróbio de batelada sequencial com biomassa imobilizada; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; PABR: reator anaeróbio compartimentado periódico; CSTR: reator contínuo de mistura perfeita; RALF: reator anaeróbio de leito fluidizado; MY: rendimento de metano; PVM: produção volumétrica de metano

## 2.6. Processos mesofílicos e termofílicos de co-digestão com soro de queijo e glicerol

Com o intuito de otimizar o processo e aumentar a produção de hidrogênio e metano, a estratégia de co-digestão tem sido amplamente estudada na literatura. Por meio da adição de

um co-substrato, pode-se adequar o meio nutricional, fornecendo nutrientes complementares, além de fontes de carbono em diferentes formas para o consumo pelos microrganismos.

Segundo Gioannis et al. (2013), o uso da co-digestão pode ser justificado por: tratamento combinado de diferentes resíduos; capacidade de tratar resíduos que são difíceis de tratar individualmente; diluição de substâncias tóxicas e/ou inibitórias para o processo; possibilidade de efeitos sinérgicos sobre a biomassa; otimização das condições para produção dos biocombustíveis; controle do pH; e otimização da relação carboidrato:proteína.

Neste sentido, a produção de hidrogênio aplicando co-digestão de lodo e glicerol em condição mesofílica (30°C) foi estudada por Sittijunda e Reungsang (2012a). Metodologia de superfície de resposta foi utilizada a fim de otimizar os parâmetros concentração de glicerol, concentração de lodo e quantidade de meio nutriente (Endo) adicionada. Assim, a condição que maximizou a produção volumétrica de hidrogênio (1,37 mmol de  $H_2.L^{-1}.h^{-1}$ ) foi: 22,19 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, concentração de lodo de 7,16 gST.L<sup>-1</sup> e 2,89 mL.L<sup>-1</sup> de adição de meio nutriente Endo. Ao comparar o resultado obtido após a otimização dos parâmetros com o resultado fornecido pela batelada sem adição de glicerol, conclui-se que a produção volumétrica da co-digestão foi duas vezes superior a PVH do ensaio controle (0,76 mmol de  $H_2.L^{-1}.h^{-1}$ ). Os principais metabólitos gerados foram etanol, 1,3-propanodiol, lactato e formiato.

Gomez-Romero et al. (2014) verificaram a produção de hidrogênio por meio da co-digestão de soro de queijo e resíduos de frutas e vegetais. Para tal, 5 diferentes razões C/N foram avaliadas: 7, 17, 21, 31, e 46. O maior rendimento alcançado foi 449,84 mL  $H_2.gDQO^{-1}$  na razão C/N de 21. Dando continuidade à investigação da co-digestão de soro com outros resíduos, Gomez-Romero et al. (2016) aplicaram a co-digestão de soro de queijo e resíduos de frutas e vegetais em processo dois estágios, o qual consistiu em um reator batelada hidrolítico e um reator CSTR hidrogenogênico. Esta estratégia foi adotada com base em seu estudo anterior, no qual os autores verificaram que a assimilação inicial de carboidratos e proteínas facilmente degradáveis permitiu o crescimento dos microrganismos e a formação de acetato e lactato como principais metabólitos. Sendo assim, utilizando a razão C/N igual a 21, na TCO de 80,02 gDQO.L<sup>-1}.d<sup>-1</sup>, o maior rendimento de hidrogênio foi observado, correspondendo a 813,3 mL de  $H_2.gDQO^{-1}$ . Quanto à produção volumétrica de hidrogênio, maiores resultados foram verificados à medida que menores TDH foram aplicados. Como conclusão, os autores verificaram que a co-digestão forneceu maior estabilidade, confiabilidade e eficiência ao processo.</sup>

A co-digestão de soro de queijo e a fração líquida de estrume de laticínio em reator UASB foi avaliada por Rico et al. (2015) verificando a razão de co-substrato e a TCO imposta no reator. Reciclos do efluente foram realizados para suplementação da alcalinidade. Ao ser submetido a TDH de 2,2 d e TCO de 19,4 kgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, o reator operou de forma estável até a proporção de 75% de soro na alimentação, obtendo remoção de 94,7% da DQO afluente e produção de metano de 6,4 m<sup>3</sup> de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. No entanto, a maior produção foi obtida com 60% de soro na alimentação, sob a TCO de 28,7 kgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> fornecendo 9,5 m<sup>3</sup> de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> e 95,1% de remoção de DQO.

A proporção de substratos em uma co-digestão é uma variável que deve ser considerada a fim de maximizar a obtenção de biocombustíveis. Marone et al. (2015) estudaram as proporções adequadas de substratos na co-digestão de resíduo de búfalo (chorume), soro de queijo e glicerol bruto em reator batelada para produção de hidrogênio. As bateladas foram ajustadas para pH inicial de 6,5 e a temperatura foi mantida a 37°C. O rendimento máximo obtido foi 111,6 ± 21,8 mL H<sub>2</sub>.gSV<sup>-1</sup> adicionado, observado em uma mistura de 66% de resíduo de búfalo e 33% de soro de queijo. Apesar do soro de queijo ser apropriado para a digestão, sua degradação leva a uma rápida queda do pH, enquanto o estrume de búfalo possui uma alta capacidade de tamponamento.

Além dos estudos que envolvem a recuperação de H<sub>2</sub>, observa-se que a co-digestão também tem sido aplicada para obtenção de metano. Neste contexto, Lovato et al. (2016) investigaram a produção de metano decorrente da co-digestão de soro de queijo e glicerina em reator anaeróbio batelada sequencial com recirculação da fase líquida. Os experimentos foram realizados a 30°C e TCO de 7,5 kgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, variando a fração de soro de queijo na mistura de 0 a 100%. A melhor produção volumétrica e rendimento de metano foram 101,8 mol de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> e 13,3 mol de CH<sub>4</sub>.kgDQO<sup>-1</sup>, respectivamente, observados na proporção 75% de soro de queijo e 25% de glicerina. A co-digestão desses dois substratos proporcionou um aumento na produção volumétrica de cerca de 9 e 30%, quando comparada a mono-digestão anaeróbia do soro de queijo e glicerol.

A co-digestão de soro de queijo e glicerol para a produção de hidrogênio foi estudada em reator de leito granular expandido, EGSB, por Lopes, Ramos e Silva (2017) sob condição mesofílica (30°C). O procedimento experimental consistiu em variar as proporções soro:glicerol em 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 e 5:5 (m/m) com TDH fixo em 8h. Posteriormente, na proporção 5:5, o TDH foi reduzido de 8 a 0,5 h. A relação 5:1 foi a que proporcionou o máximo rendimento de 0,120 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, sendo que maiores concentrações de glicerol ocasionaram produções mais elevadas de ácido, principalmente ácido propiônico. Ao diminuir

o TDH, maiores PVH foram exibidas, com valor máximo de 42,5 mL de  $H_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$  no TDH 0,5 h. As conversões de lactose e glicerol variaram de 61-98% e 45-97,6%, respectivamente.

Lovato et al. (2017) também estudaram a co-digestão de soro de queijo e glicerina em condição mesofílica (30°C) para recuperação de  $H_2$ . No entanto, os autores optaram por reator batelada sequencial (AnSBBR) para realizar seus experimentos. Neste trabalho, a relação soro de queijo:glicerina (100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100% com base na DQO) foi estudada juntamente com a influência da TCO (10,1 a 23,9  $kgDQO \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ ). A adição de glicerina ao soro de queijo apresentou-se como uma boa estratégia, devido principalmente à capacidade de tamponamento proporcionada pelo glicerol, possibilitando acréscimos de 73,2% e 60,6% na produção volumétrica e rendimento de hidrogênio ao compará-los à mono-digestão do soro. Dessa forma, o aflúente composto por 75% de soro de queijo e 25% de glicerina, com TCO de 23,9  $kgDQO \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$  produziu PVH de 129 mol de  $H_2 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$  e rendimento de 5,4 mol de  $H_2 \cdot kgDQO^{-1}$ .

O pH reacional é uma importante variável na fermentação de substratos para produção de hidrogênio, podendo inibir a atividade dos microrganismos acidogênicos e prejudicar a produção de  $H_2$  a depender de seu valor. Com o objetivo de aumentar a capacidade de tamponamento na digestão do soro de queijo e manter o pH acima de 4, Ghimire et al. (2017) investigaram a co-digestão de soro de queijo com estrume de búfalo, resíduo que apresenta uma alta alcalinidade. Na razão 4  $gSV \cdot gSV^{-1}$  de soro de queijo/estrume, rendimento de 152,2 mL de  $H_2 \cdot gSV^{-1}$  foi atingido juntamente com a produção de 215,4 mL de  $H_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ . O pH do meio reacional ficou entre 4,8 e 5. Assim, a co-digestão do soro de queijo e estrume de búfalo permitiu melhor produção de  $H_2$  e estabilidade ao processo

Silva et al. (2017) estudaram a co-digestão de glicerol e resíduo alimentar em reatores batelada a 35°C variando a porcentagem de glicerol presente na mistura. O objetivo da pesquisa foi a produção de hidrogênio. Concentrações de 1, 3 e 5% v/v de glicerol foram inseridas nos ensaios, sendo a concentração de 5% a que resultou no melhor rendimento de  $H_2$ , equivalente a 180 mL de  $H_2 \cdot gSV^{-1}$ . Já a produção volumétrica específica se manteve praticamente constante em todas as bateladas (13 mL de  $H_2 \cdot gSV^{-1} \cdot h^{-1}$ ), independente da concentração aplicada. A adição de glicerol ao meio reacional possibilitou menores tempos de aclimação da biomassa, além de favorecer a produção de ácidos voláteis e elevar a concentração de 1,3-propanodiol.

A co-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo em reator RALF para recuperação energética de  $H_2$  foi estudada por Ramos e Silva (2018). Os autores avaliaram como a composição do aflúente e o TDH influenciou na co-digestão. Assim, o TDH variou de 1 a 8 h e a concentração de soro de queijo foi aumentada no reator, o qual apresentava

concentração fixa de vinhaça de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados a 55°C e os resíduos foram degradados por cultura mista de microrganismos. A digestão da vinhaça sem adição de co-substrato forneceu rendimento de hidrogênio de 1,01 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, produção volumétrica de 2,54 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e conteúdo de hidrogênio de 47,3%. Ao adicionar 2 gDQO.L<sup>-1</sup> de soro de queijo, aumentos de 117% foram observados na produção volumétrica de H<sub>2</sub>, 68% no conteúdo de H<sub>2</sub> e 82% no rendimento de H<sub>2</sub>. Acréscimos superiores a 2 gDQO.L<sup>-1</sup> proporcionaram performance inferior do reator ao comparar com a operação somente com vinhaça.

Zahedi et al. (2018) estudaram a produção de metano em condição mesofílica (35°C) por meio da co-digestão de lodo de esgoto com glicerina em reator semi-contínuo de mistura perfeita. O efeito da TCO foi inferido diminuindo o tempo de retenção dos sólidos (SRT) de 20 para 5 d. Assim, a TCO variou de 1,03 para 4,05 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Sob condições estáveis, entre SRT de 20 e 9 d, reduções de até 85% na produção de ácidos voláteis orgânicos foram atingidas, com produção de metano de cerca de 0,8 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Em SRT abaixo de 9 d os autores observaram desestabilizações do sistema.

Com o objetivo de determinar se a co-digestão utilizando lodo de esgoto, glicerol e resíduo alimentar seria mais vantajosa para produção de metano do que somente a digestão anaeróbia do lodo, Ferreira, Volschan Jr e Cammarota (2018b) adotaram como estratégia operacional o uso de dois reatores, no qual um recebeu somente lodo de esgoto enquanto o outro foi alimentado com a mistura ternária. A mistura ternária apresentou maior estabilidade do que a digestão realizada somente com lodo. Dessa maneira, os resultados referentes à mono-digestão do lodo foram: 3 L.d<sup>-1</sup> de biogás, 23% de CH<sub>4</sub>, remoção de 65,3% dos sólidos voláteis e rendimento de metano de 98,5 L de CH<sub>4</sub>.kgSV<sup>-1</sup><sub>adicionado</sub>. Em compensação, a co-digestão apresentou produção de 21 L.d<sup>-1</sup>, 43% de CH<sub>4</sub>, 73,4% de remoção de sólidos voláteis e rendimento de 174,5 CH<sub>4</sub>.kgSV<sup>-1</sup><sub>adicionado</sub>. Dessa forma, a co-digestão permitiu uma recuperação energética 12 vezes maior do que a digestão do lodo de esgoto puro.

A produção de metano utilizando glicerol foi estudada por Sittijunda e Reungsang (2018) aplicando co-digestão de biomassa de algas e glicerol bruto em reator batelada com o objetivo de verificar as melhores condições para maximização da produção de CH<sub>4</sub>. Para tal foi utilizada a técnica estatística de superfície de resposta investigando os parâmetros concentração de biomassa de algas (0 a 29,4 gSV.L<sup>-1</sup>), concentração de glicerol (0 a 25,4 gSV.L<sup>-1</sup>) e concentração do inóculo (3,3 a 11,70 gSV.L<sup>-1</sup>). As bateladas foram acertadas em pH inicial 8 e a temperatura mantida a 35°C. As condições ótimas encontradas foram 20,02 gSV.L<sup>-1</sup> para glicerol bruto, 9,76 gSV.L<sup>-1</sup> para concentração de inóculo e 5,50 gSV.L<sup>-1</sup>

para concentração de biomassa, sucedendo na produção máxima de metano de 58,88 mL de  $\text{CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ .

Oliveira et al. (2018) aplicaram planejamento de experimentos para otimizar a produção de metano a partir da co-digestão de lodo de esgoto, glicerol e resíduo de óleo de fritura. As bateladas foram conduzidas a  $37^\circ\text{C}$ , sendo analisadas três variáveis nas respostas produção volumétrica e produção acumulativa de  $\text{CH}_4$ : concentração de lodo, concentração global dos co-substratos e fração mássica de glicerol na mistura glicerol e resíduo de óleo de fritura. A digestão pura do lodo de esgoto forneceu uma produção acumulativa de metano de  $294 \pm 6 \text{ L de } \text{CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$  e produção volumétrica de  $64 \pm 1 \text{ L de } \text{CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . A co-digestão com glicerol e resíduo de óleo de fritura aumentou em 91% a produção acumulativa e em 3 vezes a produção volumétrica de metano, com valores ótimos ( $583 \text{ L de } \text{CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$  e  $192 \text{ L de } \text{CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) alcançados na concentração de  $4,64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de lodo de esgoto associado com  $8,77 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  da mistura de co-digestão contendo fração de glicerol de 0,8.

A utilização de resíduos que contêm parcelas consideráveis de gordura tem sido evitada no processo de digestão anaeróbia, devido às inibições que podem ocorrer decorrentes da degradação de lipídeos, a qual tem como consequência o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa. No entanto, a utilização da co-digestão pode contornar este problema. Neste sentido, Rasit et al. (2019) avaliaram a adição de glicerina no tratamento de resíduos de caixa de gordura feito em reator de mistura perfeita cuja finalidade era produção de metano. Assim, 1% v/v de glicerina foi inserida no reator. As taxas de carregamento orgânico variaram de 1,3 a  $3,6 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , e o TDH de 11 a 4 d. Os autores observaram que com a adição de glicerina a fase lag diminuiu cerca de 4 d, o que interferiu positivamente na produção de metano. Ao comparar a performance do reator controle (sem adição de glicerina) com o reator no qual foi adicionado glicerina, observou-se incrementos de 31% na produção volumétrica de metano (PVM) e 35,7% no rendimento de metano ocorridos na TCO de  $2,2 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Dessa forma, a PVM do reator com glicerina foi  $0,38 \text{ L de } \text{CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e o rendimento foi  $0,19 \text{ L de } \text{CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}$ . Além disso, elevada remoção de DQO foi atingida, sendo esta igual a 90%. De acordo com os dados apresentados, a adição de glicerina na digestão anaeróbia de resíduo de caixa de gordura potencializou a produção de metano. Os autores levantaram a hipótese de que a fonte de carbono extra advinda da glicerina poderia ter induzido a taxa de crescimento da biomassa ativa e reduzido a toxicidade pelo inibidor (ácidos orgânicos de cadeia longa).

A viabilidade da aplicação do glicerol como co-substrato foi analisada por Lovato et al. (2019) utilizando uma mistura de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol. Os autores avaliaram



a influência da estratégia de alimentação dos reatores batelada sequencial, a concentração afluyente, duração do ciclo e temperatura na produção de metano. Dessa forma, utilizou-se duas estratégias de alimentação: modo batelada e modo batelada alimentada; a concentração afluyente variou de 3.750 mgDQO.L<sup>-1</sup> a 7.500 mgDQO.L<sup>-1</sup>; a duração do ciclo decresceu de 8 a 6 h; e duas temperaturas foram utilizadas: 30°C e 35°C. Avaliando todos os parâmetros mencionados, os autores concluíram que a co-digestão da vinhaça com o glicerol favoreceu a produção de metano, sendo utilizada uma proporção de glicerol igual a 1,53% v/v. O aumento da concentração afluyente possibilitou um crescimento exponencial da produtividade de metano, no entanto, ao elevar a temperatura para 35°C a produção foi prejudicada devido à maior geração de substâncias poliméricas extracelulares. Os autores observaram melhores resultados utilizando batelada alimentada, a 30°C e com uma taxa de carregamento orgânico de 10,1 kgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> (7.500 mgDQO.L<sup>-1</sup> e 6 h), alcançando PVM de 139,32 mol CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> e rendimento de metano igual a 15,30 mol CH<sub>4</sub>.kgDQO<sup>-1</sup><sub>rem</sub>.

Sawasdee, Haosagul e Pisutpaisal (2019) avaliaram a co-digestão de glicerol e glicose em reator batelada mesofílico (37°C). Para tal, a concentração de substrato foi mantida em 5.000 mgDQO.L<sup>-1</sup> variando as razões de glicerol/glicose em 0:10, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 e 10:0. A condição que forneceu o maior rendimento (47 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>) foi a razão 0:10, a qual somente glicose foi inserida na batelada. Tal fato pode ser devido a glicose ser mais favorável para produção de metano do que o glicerol, além de ter sido utilizado glicerol bruto com 63,9% de pureza. No entanto, a condição ótima para operação utilizando o glicerol correspondeu a razão 5:5, a qual forneceu produção acumulativa de metano igual a 298,2 mL e máxima velocidade de produção de 8 mL de CH<sub>4</sub>.h<sup>-1</sup>, além de rendimento equivalente a 31,2 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.

A co-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo foi utilizada por Albuquerque, Ratusznei e Rodrigues (2019) para avaliar a produção de metano em reator batelada sequencial alimentada. O estudo foi dividido em 4 etapas: composição da água residuária (75% v/v de soro de queijo, 50% v/v de soro de queijo e 25% v/v de soro de queijo), otimização (5 gDQO.L<sup>-1</sup>, 10 gDQO.L<sup>-1</sup>, 15 gDQO.L<sup>-1</sup> e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>), estratégia de alimentação (batelada ou batelada alimentada) e temperatura (45, 50 e 55°C). Ressalta-se que as etapas 1, 2 e 3 foram realizadas a 55°C. Dessa forma, os melhores resultados foram: água residuária composta por 25% v/v de soro de queijo e 75% v/v de vinhaça, taxa de carregamento orgânico de 25 gDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> no modo batelada alimentada (20 gDQO.L<sup>-1</sup>) e temperatura de 55°C. Assim, o rendimento de metano foi de 15,3 mmol de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, produção volumétrica

igual a 278 mol de  $\text{CH}_4 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  e remoção de 71% da carga orgânica volumétrica aplicada. Ácido acético foi o metabólito predominante em todos os ensaios realizados.

Hallaji, Kuroshkarim e Moussavi (2019) estudaram a co-digestão de lodo ativado, resíduos de frutas e soro de queijo para produção de metano em condição mesofílica. A co-digestão apresentou melhores resultados do que a digestão anaeróbia do lodo individualmente, além de aumentar em 22% e 9% a atividade das enzimas protease e celulase. A produção acumulativa de biogás na co-digestão foi cerca de 2970 mL, sendo aproximadamente 33% maior do que o valor observado no reator controle (somente lodo). O rendimento de metano no reator composto por 85% de lodo e 15% da mistura resíduo de frutas e soro de queijo foi de 384,1 mL de  $\text{CH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1}$  adicionado, 31% a mais do que o rendimento do reator que continha somente lodo. Os autores atribuíram a melhora na atividade enzimática ao balanço da relação C/N proporcionado pela co-digestão. Como consequência do desempenho das enzimas hidrolíticas, maior quantidade de matéria orgânica biodegradável passou a estar disponível para os microrganismos, o que pode ter favorecido a produção de biogás.

Glicerol bruto proveniente da transesterificação de lodo de matadouro foi co-digerido com água residuária de laticínio nos estudos de Chou e Su (2019). Os autores realizaram os experimentos em reatores batelada sob temperatura de 35°C, avaliando a proporção de glicerol aplicada no meio, variando-a em 2, 4 e 8% v/v. A adição de glicerol favoreceu a produção de biogás nas três concentrações estudadas, gerando volumes superiores aos observado no experimento controle (sem adição de glicerol bruto). Porém, dentre todas as bateladas, a batelada com 8% v/v de glicerol bruto forneceu o maior acúmulo de biogás, 4383,3 mL, sendo, aproximadamente, 159% maior do que a obtida no reator controle. A porcentagem média de metano não apresentou diferença significativa entre as bateladas, sendo o reator com 8% v/v (CG8) composto por 73,10% de metano. Acúmulo de ácidos orgânicos voláteis foi observado nos reatores, com maiores quantidades presentes no CG8, sendo ácido butírico o metabólito em maior concentração. Assim, o pH dos reatores com 2 e 4% v/v de glicerol e o reator controle decresceu, permanecendo acima de 6,7. No entanto, o pH do reator com 8% v/v chegou a 5,76. Os autores ainda verificaram que a concentração de ácidos nos reatores diminuiu no decorrer da operação, com exceção apenas da batelada com 8% v/v de glicerol, constatando que o decréscimo do pH pode ter inibido o crescimento das *archaeas* metanogênicas e ocasionado um desequilíbrio no reator.

Sousa et al. (2019) estudaram a co-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo em reator batelada sequencial (AnSBBR) avaliando a estratégia de alimentação, interação entre os tempos de ciclo e concentração afluente, carga orgânica volumétrica aplicada

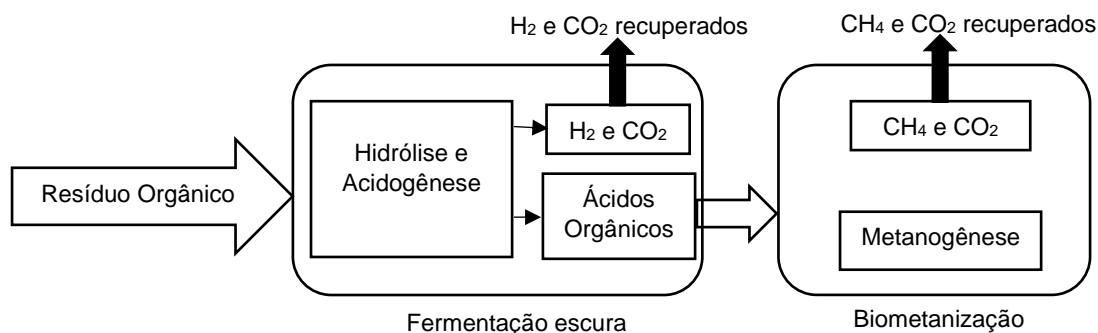
e temperatura. Os autores verificaram que as estratégias de alimentação, batelada e batelada alimentada, não apresentaram resultados muito distintos, indicando uma flexibilidade neste parâmetro. Com relação ao tempo de ciclo e concentração afluente, as variações foram: 8, 6 e 4 h e 5000, 3750 e 2500 mgDQO.L<sup>-1</sup>, mantendo sempre a mesma TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os autores observaram que o maior tempo de ciclo (8 h) juntamente com a maior concentração (5000 mgDQO.L<sup>-1</sup>) proporcionou o melhor desempenho em relação aos demais experimentos, com remoção de DQO de 91% e rendimento de metano de 10,52 mmol de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. A carga orgânica volumétrica foi avaliada em 5, 7,5, 10 e 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, apresentado os melhores resultados na TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, com rendimento e produção volumétrica de CH<sub>4</sub> de 15,76 mmol de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e 208,5 mol de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. As temperaturas de 30 e 35°C apresentaram resultados similares, enquanto a 25 °C os resultados foram inferiores.

## **2.7. Processos mesofílicos e termofílicos em dois estágios com soro de queijo e glicerol**

Como discutido anteriormente, a obtenção de energia por meio da digestão anaeróbia é uma alternativa para produção de energia renovável que tem sido amplamente estudada (LÓPEZ et al., 2009; PERNA et al., 2013; OTTAVIANO et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2017a). De forma geral, o processo pode ser dividido em duas etapas principais: acidogênese e metanogênese. Durante a primeira etapa têm-se as bactérias acidogênicas atuando no processo, enquanto na segunda etapa são as *archaeas* metanogênicas os microrganismos responsáveis pelos produtos finais (CREMONEZ et al., 2021). Entretanto, os dois grupos de microrganismos citados anteriormente diferem significativamente com relação a fisiologia, necessidades nutricionais, crescimento microbiano, características metabólicas e condições ambientais favoráveis (POHLAND; GHOSH, 1971).

Com o objetivo de otimizar a estabilização de resíduos orgânicos, Pohland e Ghosh (1971) propuseram um processo em dois estágios, no qual a fase acidogênica e metanogênica ocorrem em reatores distintos. Dessa maneira é possível operar os reatores nas condições favoráveis para cada fase, e explorar ainda mais o potencial energético do substrato, obtendo-se hidrogênio do reator acidogênico e metano do reator metanogênico. Nesta configuração os microrganismos consumidores de hidrogênio são inibidos no reator acidogênico, sendo a digestão anaeróbia interrompida na acidogênese, enquanto no segundo reator o processo ocorre por completo.

Ghimire et al. (2015) apresentaram um esquema simplificado para o processo em dois estágios, também conhecido como duas fases ou sequencial, cuja finalidade é a recuperação de hidrogênio e metano, conforme a Figura 7.



**Figura 7** – Processo em dois estágios para produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Adaptado de Ghimire et al. (2015)

Schievano et al. (2014) associam o crescente interesse e estudo na digestão anaeróbia em dois estágios devido ao aumento do desempenho geral do processo (estabilidade e eficiência de degradação orgânica em ambas as fases), e ao favorecimento da produção de CH<sub>4</sub> no reator metanogênico como consequência da produção de ácidos orgânicos voláteis no reator acidogênico. Além dessas vantagens, o processo em dois estágios permite a aplicação de maiores TCO no reator metanogênico do que o processo em fase única, otimização dos reatores de cada estágio (CREMONEZ et al., 2021), e necessita de menores quantidades de alcalinizantes, uma vez que os problemas com acidificação e comprometimento da atividade das *archaeas* metanogênicas podem ser minimizados. A complexidade da água residuária também é outro ponto crítico na digestão anaeróbia que tem seu impacto suavizado pois as etapas de hidrólise/fermentação ocorrem em reator à parte, e podem ser manipulados da melhor maneira para assimilação dos microrganismos e conversão à ácidos orgânicos, sem que isso afete as condições mais adequadas para o reator metanogênico.

O soro de queijo e o glicerol são substratos constantemente empregados em pesquisas que visam a produção de hidrogênio e metano por meio da fermentação e digestão anaeróbia. A seguir são apresentados alguns trabalhos que utilizaram esses materiais na operação em dois estágios para produção sequencial de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>.

Antonopoulou et al. (2008) estudaram a produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> sob condições mesofílica (35°C) utilizando soro de queijo como substrato. Produção de 7,53 L de H<sub>2</sub>.d<sup>-1</sup> foi observada no reator acidogênico, enquanto o reator metanogênico produziu 75,6 L de CH<sub>4</sub>.d<sup>-1</sup>, sendo empregados os TDH de 24 h e 4,4 d, respectivamente. A remoção de DQO na fase

metanogênica foi de 94%. Para que ocorresse a produção de H<sub>2</sub> constituindo ao menos 25% do biogás, o reator acidogênico foi mantido no pH 5,2 por meio da adição de 20 g NaHCO<sub>3</sub>/L. Os principais metabólitos foram ácido acético, lático e butírico, sendo detectados em níveis inferiores ácido propiônico e etanol. No reator metanogênico, ácido acético foi o único metabólito identificado, com aumento de sua concentração à medida que o TDH diminuiu. Neste estudo nenhum consórcio de microrganismos foi adicionado ao processo, sendo os próprios microrganismos do soro de queijo responsáveis pela fermentação. Os autores destacaram a capacidade de produção de H<sub>2</sub> pelo soro de queijo cru como relevante para a indústria do leite, uma vez que nenhuma energia adicional seria necessária para o início da operação de fermentação.

A produção em dois estágios utilizando soro de queijo também foi avaliada por Venetsaneas et al. (2009). No entanto, os autores utilizaram reatores CSTR sob condição mesofílica (35°C). O inóculo adotado para o primeiro estágio foi composto por microrganismos indígenas do soro de queijo, enquanto o reator do segundo estágio foi inoculado com lodo de estação de tratamento biológico municipal. Neste estudo os autores abordaram 2 estratégias diferentes para controle do pH no reator acidogênico: controle do pH por adição de alcalinidade (NaHCO<sub>3</sub>) e controle realizado por um controlador automático (adição de NaOH). As taxas de produção de hidrogênio alcançadas foram  $2,9 \pm 0,2$  L de H<sub>2</sub>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e  $1,9 \pm 0,1$  L de H<sub>2</sub>.L<sub>reator</sub><sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para controle por adição de NaHCO<sub>3</sub> e por controlador automático, respectivamente. A produção de metano no segundo estágio foi aproximadamente 1 L de CH<sub>4</sub>.d<sup>-1</sup>, sendo o reator alimentado com o efluente acidogênico cujo pH foi controlado pela adição de alcalinidade. Ácido acético, butírico, lático e etanol foram os principais metabólitos encontrados no primeiro estágio, já o segundo estágio constitui-se principalmente de ácido acético e butírico, ainda que em baixos níveis.

Cota-Navarro et al. (2011) estudaram o emprego de soro de queijo em pó na produção volumétrica de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> em operação contínua. Neste trabalho verificou-se a influência do TDH e da TCO nas faixas de operação 6-3,5 h e 95-190 g de lactose.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para o reator acidogênico e, TDH de 6 e 12 h e TCO de 14 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para ao reator metanogênico. Os reatores também diferiram quanto ao tipo de reator e a temperatura, sendo adotado no primeiro estágio reator CSTR a 37°C e no segundo estágio reator UASB a temperatura ambiente (25-30°C). A TCO de 142 g de lactose.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 6 h, foram as condições que forneceram a máxima produção volumétrica durante operação estável, alcançando 25 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Com relação ao metano, PVM máxima de 5 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi observada no TDH de 6 h e TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Dessa forma, o tempo total do processo foi de 0,5 d.

A operação em dois estágios permitiu a recuperação de 70% da energia presente no substrato com remoção acima de 90% da carga orgânica.

Aplicando diferentes substratos no processo anaeróbio em dois estágios, Peixoto et al. (2012) estudaram a recuperação de  $H_2$  e  $CH_4$  utilizando esgoto, vinhaça de cana de açúcar, água residuária de arroz e glicerol. Os experimentos foram realizados em reatores batelada sob condição mesofílica ( $25^\circ C$ ), sendo todos os substratos utilizados diluídos para concentração de  $300 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ . Lodo de reatores anaeróbios de leito fixo utilizados para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias sintéticas foi utilizado para inoculação do reator do primeiro estágio, enquanto o segundo estágio foi inoculado com lodo de reator UASB de tratamento de efluentes de matadouro de aves. As bateladas constituídas de glicerol e esgoto não apresentaram produção de hidrogênio no primeiro estágio, enquanto as compostas por água residuária de arroz e vinhaça forneceram um rendimento de  $H_2$  de 23,9 e 20,79 mL de  $H_2.gDQO^{-1}$ , respectivamente. Os autores atribuíram a ausência de  $H_2$  nas bateladas de glicerol ao curto tempo do experimento (42 h). O rendimento do metano no segundo estágio foi de 46,36 mL de  $CH_4.gDQO^{-1}$  (esgoto), 180,14 mL de  $CH_4.gDQO^{-1}$  (glicerol) 115,55 mL de  $CH_4.gDQO^{-1}$  (arroz) e 255,44 mL de  $CH_4.gDQO^{-1}$  (vinhaça). A vinhaça foi o substrato que apresentou maior recuperação energética, com um potencial global incluindo ambas as fases de  $10,48 \text{ kJ.gDQO}^{-1}$  e remoção de matéria orgânica de 74,72%. O glicerol foi o segundo melhor substrato com potencial energético global de  $7,20 \text{ kJ.gDQO}^{-1}$  e remoção de DQO de 70,38%. Os metabólitos predominantes do reator acidogênico contendo glicerol foram ácido propiônico, butírico, láctico e acético. Dessa forma, conclui-se que os microrganismos seguiram pela rota do ácido propiônico, a qual não favorece a produção de  $H_2$ .

Rivero, Solera e Perez (2014) avaliaram a co-digestão de lodo de esgoto de tratamento de águas residuárias de plantas com glicerol bruto em reator CSTR. Processo em dois estágios foi conduzido sob temperatura na faixa mesofílica com o objetivo de verificar o efeito da TCO. Dentre as TCO avaliadas, a menor taxa ( $7,82 \text{ gDQO.L}^{-1}.d^{-1}$ ) foi a que apresentou a melhor condição operacional, com rendimento de hidrogênio e metano,  $0,026 \text{ L de } H_2.gDQO_{rem}^{-1}$  e  $0,29 \text{ L de } CH_4.gDQO_{rem}^{-1}$ , respectivamente, sendo 93% da matéria orgânica removida durante o processo.

A co-digestão de sorgo ensilado, estrume de vaca líquido e soro de queijo foi aplicada em processo dois estágios por Dareioti e Kornaros (2015) para estudo da produção sequencial de  $H_2$  e  $CH_4$ , sendo utilizado dois reatores CSTR mesofílicos ( $37^\circ C$ ). A proporção volumétrica de cada substrato na mistura se deu da seguinte forma: 55% de sorgo, 40% de soro de queijo e 5% de estrume. O TDH foi um dos parâmetros avaliados, variando em 5, 3, 2, 1, 0,75 e 0,5 dias

para o reator acidogênico e 24, 26 e 12 d no reator metanogênico. O máximo rendimento de  $H_2$  e  $CH_4$  foram exibidos no TDH de 0,5 d e 24 d, resultando em  $0,70 \text{ mol de } H_2 \cdot \text{mol de carboidrato}^{-1}_{\text{cons}}$  e  $223,09 \text{ mL de } CH_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ , e a maior produção volumétrica nos TDH de 0,5 d e 16 d, correspondendo a  $2,14 \text{ L de } H_2 \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e  $0,9 \text{ mL de } CH_4 \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente. Abaixo do TDH de 12 d os autores observaram instabilidades no reator metanogênico, assim como inibição da produção de metano devido ao acúmulo de ácidos. A concentração de ácidos no reator metanogênico para os TDH de 24, 16 e 12 d foram  $0,30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0,41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $19,51 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , sendo originados principalmente do acúmulo de ácido acético.

Zhong, Stevens e Hansen (2015) investigaram a operação em duas fases em reator de leite induzido (IBR) utilizando resíduo de processamento de laticínios, composto de 40-50% v/v de soro de queijo. O esquema operacional consistiu em duas etapas, sendo realizado na primeira a otimização de variáveis operacionais na produção de  $H_2$ , e posteriormente, as condições ideais do reator acidogênico foram empregadas para o processo em dois estágios. Temperatura, TDH e pH foram avaliados no primeiro estágio nos seguintes valores:  $40$  e  $60^\circ\text{C}$ , 1,3 e 5 dias e nas faixas de pH 4-4,5, 4,8-5,3 e 5,5-6. No reator metanogênico adotou-se pH 6,8-7,5 e  $40^\circ\text{C}$ . O máximo rendimento de  $H_2$  foi  $160,7 \text{ ml de } H_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{rem}}$  observado em  $60^\circ\text{C}$ , TDH de 3 dias e pH 4,8-5,5, e de metano foi  $178,1 \text{ ml de } CH_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{rem}}$  no TDH de 15 d. A operação em dois estágios proporcionou maior remoção total de DQO (88,2%).

A fim de verificar se o processo em dois estágios acarretaria em incrementos na produção de  $CH_4$  a partir de soro de queijo, Fernández et al. (2015) empregaram processo dois estágios em reatores batelada, e compararam os resultados obtidos com o processo em um estágio. O reator acidogênico foi operado em condição mesofílica ( $35^\circ\text{C}$ ), enquanto o metanogênico permaneceu em  $55^\circ\text{C}$ . Semelhante a Antonopoulo et al. (2008), neste trabalho o inóculo utilizado foi composto pelos microrganismos indígenas do soro. Diferente do processo cuja finalidade era somente a produção de  $CH_4$ , a operação em dois estágios apresentou certa instabilidade no reator metanogênico, indicando uma inibição em decorrência do acúmulo de ácidos orgânicos. Dessa forma, o menor TDH alcançado para a operação em duas fases foi 12,5 d, enquanto para a fase única foi 8,3 d. Nestes TDH o rendimento de metano foi  $314,5 \pm 6,6 \text{ L de } CH_4 \cdot \text{kgDQO}^{-1}_{\text{apli}}$  para o reator metanogênico de estágio único e  $340,4 \pm 40 \text{ L de } CH_4 \cdot \text{kgDQO}^{-1}_{\text{apli}}$  para o reator metanogênio do segundo estágio. Dessa forma, nota-se que a operação em dois estágios, apesar das instabilidades apresentadas, proporcionou um favorecimento para recuperação de  $CH_4$  quando comparada à operação em um estágio. Com relação aos metabólitos, no reator produtor de  $H_2$ , ácido acético e propiônico foram os

mais abundantes. No segundo estágio, maiores concentrações de ácidos foram encontrados em comparação ao experimento de estágio único. No entanto, nos dois casos, ácido acético e propiônico foram os principais metabólitos. Os autores ainda realizaram um balanço energético baseado nos melhores resultados de cada configuração. As duas formas de operação se mostraram energeticamente viáveis, no entanto a digestão anaeróbia em dois estágios apresentou uma recuperação de  $6422,7 \text{ kJ.kgDQO}^{-1}_{\text{apli}}$  e a em estágio único forneceu  $5934,0 \text{ kJ.kgDQO}^{-1}_{\text{apli}}$ .

Dounavis et al. (2016) analisaram o glicerol para produção sequencial de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ . Os inóculos utilizados foram: cultura acidogênica derivada de lodo ativado para o reator acidogênico e lodo anaeróbio de digestor de estação de tratamento de efluentes para o reator metanogênico. Reatores contínuos foram utilizados em temperatura na faixa mesofílica ( $35^\circ\text{C}$ ), sendo adotado para fase acidogênica reator de leito fixo, enquanto a fase metanogênica foi operada em reator CSTR. Duas concentrações foram utilizadas no reator acidogênico:  $20 \text{ g}_{\text{glicerol}}.\text{L}^{-1}$  e  $25 \text{ g}_{\text{glicerol}}.\text{L}^{-1}$ . O rendimento de hidrogênio se mostrou maior para a concentração de  $25 \text{ g}_{\text{glicerol}}.\text{L}^{-1}$  ( $0,52 \pm 0,04 \text{ mol de H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{glicerolconsumido}}$ ) em comparação com o rendimento fornecido na concentração inferior, a qual gerou  $0,40 \pm 0,04 \text{ mol de H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{glicerolconsumido}}$ . A produção de alguns metabólitos, como por exemplo butirato, foi afetada pela diferença na concentração. Entretanto, a produção de propanodiol, metabólito predominante, não sofreu alterações significativas. O aumento de  $\text{H}_2$  na maior concentração pode ser explicado pelo aumento de ácido butírico observado na concentração de  $25 \text{ g}.\text{L}^{-1}$ . O reator metanogênico foi alimentado com uma mistura dos efluentes das duas concentrações. O maior rendimento de metano foi de  $0,29 \text{ L de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ , produzido na TCO de  $1,58 \text{ gDQO}.\text{d}^{-1}.\text{L}^{-1}$  (concentração de  $10,66 \text{ gDQO}.\text{L}^{-1}$ ). Vale ressaltar que este resultado foi obtido com a diluição dos efluentes para alimentação do reator metanogênico, no entanto, a alimentação realizada com efluente não diluído atribuiu ao processo um rendimento de  $0,25 \text{ L de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ .

Kothari et al. (2017) estudaram o emprego de água residuária de laticínios para produção sequencial de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  utilizando reatores bateladas a  $35^\circ\text{C}$ . O reator acidogênico foi inoculado com uma cultura pura de bactérias *Enterobacter aerogens* e o reator metanogênico com lodo digerido de esterco de vaca. Diversas concentrações foram avaliadas (25, 50, 75 e 100%), verificando-se os melhores resultados para a concentração de 75% tanto para o rendimento de hidrogênio ( $105 \text{ mL de H}_2.\text{gDQO}^{-1}$ ) quanto para o rendimento de metano ( $190 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ ). Neste trabalho ainda foi realizada uma análise técnico-econômica do lucro obtido sobre a recuperação energética alcançada, de acordo com a metodologia



proposta por Park et al. (2010). A produção de  $H_2$  resultou em lucro de 0,22\$ por  $m^3$  de água residuária de laticínio, enquanto a produção de  $CH_4$  possibilitou retorno de 0,336\$ por  $m^3$  de fermentado de água residuária de laticínio.

A co-digestão da água residuária de biodiesel com glicerina para produção sequencial de hidrogênio e metano foi avaliada por Tangkathitipong et al. (2017) em reatores bateladas na temperatura de 37°C. O efluente do reator metanogênico foi recirculado para o acidogênico mantendo o pH de 5,5 no primeiro estágio, enquanto o pH do reator metanogênico não foi controlado. As TCO estudadas foram baseadas no volume do reator metanogênico equivalendo ao intervalo 5,63-14,6  $kg.m^{-3}.d^{-1}$ . Tanto para produção de hidrogênio quanto para produção de metano, as melhores respostas atingidas foram na TCO de 11,25  $kg.m^{-3}.d^{-1}$ , sendo essas 333 mL de  $H_2.L^{-1}.d^{-1}$  e 672,84 mL de  $CH_4.L^{-1}.d^{-1}$ . Os principais ácidos produzidos no reator acidogênico em ordem de concentração foram: ácido butírico, valérico, acético e propiônico. Etanol e 1,3-propanodiol se mantiveram em baixas concentrações e não sofreram alteração significativa com mudanças na TCO, enquanto os demais ácidos aumentaram sua concentração à medida que a TCO aumentou. No reator metanogênico houve mudanças com relação aos ácidos de maior concentração, sendo a seguinte ordem observada: ácido acético, propiônico, butírico e valérico. O sistema em duas fases proporcionou remoção de 76,7% da matéria orgânica.

Kanchanasuta e Sillaparassamee (2017) empregaram a co-digestão de torta de decantador de óleo de palma e glicerol bruto no processo em dois estágios utilizando reator acidogênico termofílico e reator metanogênico mesofílico. Os autores verificaram que além de beneficiar a produção de metano e recuperação energética dos substratos, o glicerol auxiliou na manutenção do pH no reator acidogênico. A máxima PVH e rendimento de hidrogênio foram 461 mL de  $H_2.L^{-1}.d^{-1}$  e 23 L de  $H_2.kgTS^{-1}_{adicionada}$ , as quais ocorreram com 1,5% de glicerol na alimentação. No segundo estágio os melhores resultados de PVM e rendimento de metano ocorreram com a alimentação do efluente do reator acidogênico da condição 0,75% de glicerol bruto, equivalendo a 736 mL de  $CH_4.L^{-1}.d^{-1}$  e 44 L de  $CH_4.kgTS^{-1}_{adicionada}$ , respectivamente. Nesta condição, os metabólitos presentes em maiores concentrações foram ácido butírico, etanol, ácido acético e ácido propiônico. A recuperação energética total para 0,75% de glicerol bruto na alimentação foi de 0,056  $KWh.kgTS^{-1}_{adicionada}$ .

A operação em dois estágios também foi alvo do estudo de Zahedi et al. (2017), no qual a co-digestão de resíduos sólidos municipais e resíduo de glicerina foi realizada a 55°C em reatores CSTR. No reator acidogênico o TDH de 1,5 d e TCO de 63,1  $gSV.L^{-1}.d^{-1}$  foram mantidos durante toda a operação, variando a TCO do reator metanogênico em 5,6-

18,7 gSV.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 3-10 d. Dessa forma, a TCO total variou de 8,2-21,1 gSV.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e o TDH de 4,5 a 11,5 d. As condições ótimas encontradas nas faixas estudadas foram TDH de 5,9 d e TCO de 16,1 gSV.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, as quais forneceram 2,6 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 3,4 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Com relação aos metabólitos produzidos no primeiro e segundo estágios, nota-se diferenças na proporção dos ácidos, sendo que no reator acidogênico predominou a formação de ácido butírico e ácido acético, enquanto no reator metanogênico a maior fração foi de ácido propiônico.

Silva et al. (2018) realizaram a co-digestão de resíduos alimentares, lodo de esgoto e glicerol em processo dois estágios utilizando reator batelada mesofílico (35°C). Os autores adotaram como inóculo lodo de digestor anaeróbico de uma estação municipal de tratamento de esgoto. Neste trabalho foi comprovada a eficiência da adição de glicerol na mistura ao comparar a produção energética de estudos anteriores, realizados somente com a co-digestão dos resíduos alimentares e do lodo, com os resultados da mistura ternária utilizada (resíduos alimentares, lodo e glicerol). A adição de glicerol consistiu em 1% e 3% (v/v), sendo observado algumas instabilidades na proporção de 3% com relação a quedas no pH e rendimento de metano, devido ao acúmulo de ácidos, fato que não ocorreu na concentração de 1%. De acordo com os resultados do estudo, a inclusão do glicerol pode acelerar o crescimento microbiano, e, conseqüentemente, a hidrólise dos substratos, proporcionando maior produtividade de H<sub>2</sub>. O maior rendimento de hidrogênio ocorreu com 3% de glicerol (179,3 mL de H<sub>2</sub>.gSV<sup>-1</sup>), oposto do que ocorreu com rendimento de metano, o qual obteve seu máximo com a adição de 1% de glicerol (342 mL de CH<sub>4</sub>.gSV<sup>-1</sup>). A maior remoção de DQO também foi observada para a mistura contendo 1% (77%), assim como a maior recuperação energética global do processo (reator acidogênico + reator metanogênico).

A produção simultânea de hidrogênio e metano a partir de soro de queijo foi avaliada por Ramos et al. (2020) utilizando reator EGSB mesofílico (30°C). A influência do TDH foi estudada empregando um intervalo de 0,25 h a 8 h, com uma concentração de carboidratos fixa em 5000 mg.L<sup>-1</sup>. Assim, os autores verificaram um acréscimo na porcentagem de hidrogênio no biogás ao diminuir o TDH de 8 h para 0,25 h, atingindo a média de 39,6% no TDH de 0,25 h. Mesmo com o pré-tratamento térmico realizado no inóculo e com o pH abaixo de 5, metano passou a ser produzido no reator a partir do TDH de 4 h. Porém, o decréscimo do TDH diminuiu a porcentagem de metano no biogás, sendo o TDH de 4 h responsável pela maior média (28,9%) observada. Os autores associaram a produção de metano ao fato do inóculo ser formado por grânulos, os quais apresentavam organismos metanogênicos e acidogênicos. O rendimento de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> apresentou comportamento semelhante a composição de biogás, com

rendimento de  $3,2 \text{ mL H}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{apli}}$  no TDH de 0,25 h (TCO de  $610 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) e rendimento de  $\text{CH}_4$  de  $67,1 \text{ mL de CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{rem}}$  (TCO de  $40 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) no TDH de 4 h. O aumento da TCO foi prejudicial para produção de metano devido a uma sobrecarga do reator. Os principais metabólitos foram ácido acético, butírico, propiônico e lático.

A co-digestão de soro de queijo e glicerol em processo dois estágios foi avaliada previamente por Lovato et al. (2020) em reator AnSBBR mesofílico. Os autores verificaram com o aumento na TCO de 3,6 para  $10,7 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  acréscimos na produção de metano do reator metanogênico do segundo estágio. Assim, o maior rendimento e PVM foram observados em  $10,7 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , sendo iguais a  $16,5 \text{ mol CH}_4 \cdot \text{kgDQO}^{-1}$  e  $185,9 \text{ mol CH}_4 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente.

Como pode ser observado, a adoção de uma configuração em dois estágios se mostra interessante energeticamente para muitos substratos, além disso, graças ao fato da matéria orgânica hidrolisada e fermentada ser mais disponível para os microrganismos metanogênicos, menores tempos são requeridos para realização de todo o processo (SCHIEVANO et al., 2012). No entanto, como apontado por Gioannis et al. (2017), o sistema em estágio único é um processo já bem estabelecido para o tratamento de resíduos orgânicos, além de ser economicamente viável, de baixo investimento e custos operacionais. Porém, conforme apresentado nos trabalhos descritos anteriormente, o processo em dois estágios proporciona benefícios operacionais de otimização, como utilização de diferentes temperaturas e pH para acidogênese e metanogênese, que não são possíveis no processo em estágio único e que podem comprometer o desempenho do processo. Além disso, identifica-se a possibilidade de se utilizar no processo em dois estágios maiores TCO do que no processo em estágio único. Dessa maneira, deve-se considerar em que circunstâncias a operação em dois estágios se torna mais adequada em comparação com a operação em estágio único.

## 2.8. Considerações finais

A aplicação do soro de queijo e do glicerol em reatores anaeróbios tem sido recorrente. Porém, poucas são as pesquisas que abordam a conversão do soro de queijo e do glicerol em biocombustíveis utilizando reator RALF, apesar das suas vantagens com relação aos menores tempos de detenção hidráulica e altas taxas de carregamento orgânico (ROSA, 2014; OTTAVIANO et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2017a; PARANHOS; SILVA, 2020; COSTA et al., 2021; SIMÕES et al., 2021). Verifica-se nesses estudos limitações com relação a concentração de glicerol (COSTA et al., 2021), e foco para produção de  $\text{H}_2$  (ROSA, 2014; OTTAVIANO et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2017a; PARANHOS; SILVA, 2020; SIMÕES

et al., 2021) não sendo observado estudos para produção de  $\text{CH}_4$  em RALF termofílico a partir de soro de queijo. Assim, conclui-se que ainda há muito a ser explorado neste campo.

A aplicação da co-digestão do soro de queijo e do glicerol também não é observada na literatura em reator RALF, ainda que tenham sido apresentados bons resultados dessa co-digestão, conforme exibido por Lovato et al. (2016) e Lovato et al. (2017) aplicando AnSBBR mesofílico. Na verdade, a avaliação da co-digestão de soro de queijo e glicerol foi explorada apenas em condição mesofílica, sendo observado foco para produção de hidrogênio (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017; LOVATO et al., 2017; MIRZOYAN; TRCHOUNIAN; TRCHOUNIAN, 2019), e apenas o trabalho de Lovato et al. (2016) para a produção de metano em estágio único e Lovato et al. (2020) para produção de metano em dois estágios.

De acordo com a literatura apresentada, a adoção da digestão anaeróbia em dois estágios acarreta benefícios para o processo, garantindo melhor eficiência de remoção de matéria orgânica e incrementos na produção de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ , não tendo sido observado nos trabalhos descritos na revisão casos em que o processo em estágio único tenha se sobressaído em termos de produção energética. Além disso, a separação de fases minimiza impactos relacionados a acidificação excessiva que são comumente observados na digestão anaeróbia de soro de queijo e glicerol, e permite a aplicação de diferentes parâmetros em cada fase, como por exemplo, diferentes temperaturas e TDH.

Sendo assim, perante as possibilidades de exploração energética do soro de queijo e do glicerol, este trabalho pretende contribuir para área investigando a aplicação da co-digestão destes substratos em reator anaeróbio de leito fluidizado para produção de biocombustíveis. Dessa maneira, este estudo propõe realizar esta tarefa de forma que traga benefícios para o processo, utilizando para isso um processo em dois estágios, o qual vai possibilitar a produção simultânea de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  e possíveis incrementos na produção de metano.

Dessa maneira, este trabalho objetiva determinar as melhores condições quanto a concentração, temperatura e estratégia de operação, com ou sem separação de fase, para produção de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ . Além disso, a adoção do reator de leito fluidizado nestas configurações também seria um diferencial do trabalho, uma vez que lacunas podem ser observadas no que diz respeito a utilização deste equipamento para operações em duas fases.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão apresentados os procedimentos realizados na operação dos reatores. Por simplificação de nomenclatura os reatores serão denominados da seguinte forma:

- Reator Acidogênico Termofílico: RA-T
- Reator Metanogênico Sequencial Termofílico: RS-T
- Reator Metanogênico Termofílico de Fase Única: RU-T
- Reator Metanogênico Sequencial Mesofílico: RS-M

#### 3.1. Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF)

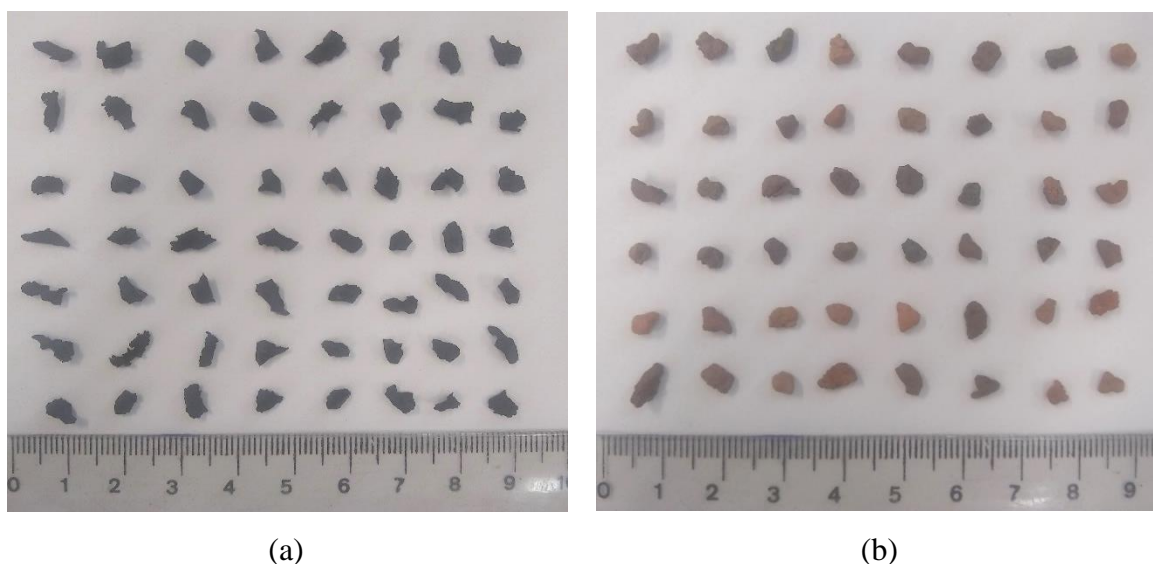
Os reatores anaeróbios de leito fluidizado utilizados nesta pesquisa foram fabricados com aço inox 304, apresentando altura de 1,5 m e diâmetro interno de 4,1 cm. As condições fluidodinâmicas do reator com leito composto por cinasita e pneu triturado, como velocidade de mínima fluidização e vazão de recirculação, foram determinadas de acordo com os dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga descritos em Amorim (2009) e Barros (2009), respectivamente.

O material suporte adotado no reator acidogênico foi cinasita (argila expandida), a qual se mostrou eficiente para a produção de  $H_2$  em diversos estudos aplicando RALF (AMORIM, 2009; BARROS et al., 2010; COSTA, 2017). Para a formação de biofilme nos reatores metanogênicos utilizou-se pneu triturado como material suporte, baseando-se em trabalhos que empregaram o leito fluidizado para produção de metano (COSTA, 2017; SIMÕES, 2017). As partículas de cinasita e pneu triturado selecionadas foram as que passaram na peneira de mesh 6 (3,35 mm) e ficaram retidas na peneira de mesh 7 (2,80 cm). A Tabela 5 contém as propriedades desses materiais suporte e na Figura 8 são exibidas algumas das partículas utilizadas neste trabalho.

**Tabela 5** – Propriedades físicas da cinasita e do pneu triturado

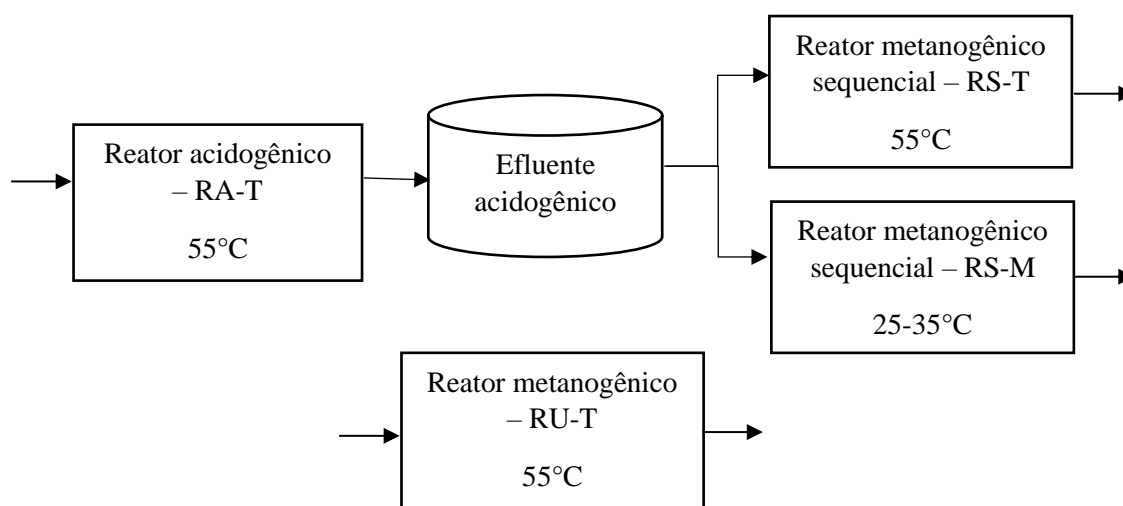
Material	$D_p$ (mm)	$\rho_p$ (g.cm <sup>-3</sup> )	Porosidade (%)	$V_{mf}$ (cm.s <sup>-1</sup> )
Cinasita	2,8 – 3,35	1,50	23	1,24
Pneu triturado	2,8 – 3,35	1,14	18	1,18

D<sub>p</sub>: diâmetro da partícula;  $\rho_p$ : densidade da partícula;  $V_{mf}$ : velocidade de mínima fluidização. Fonte: BARROS et al. (2010); BARROS et al. (2012)

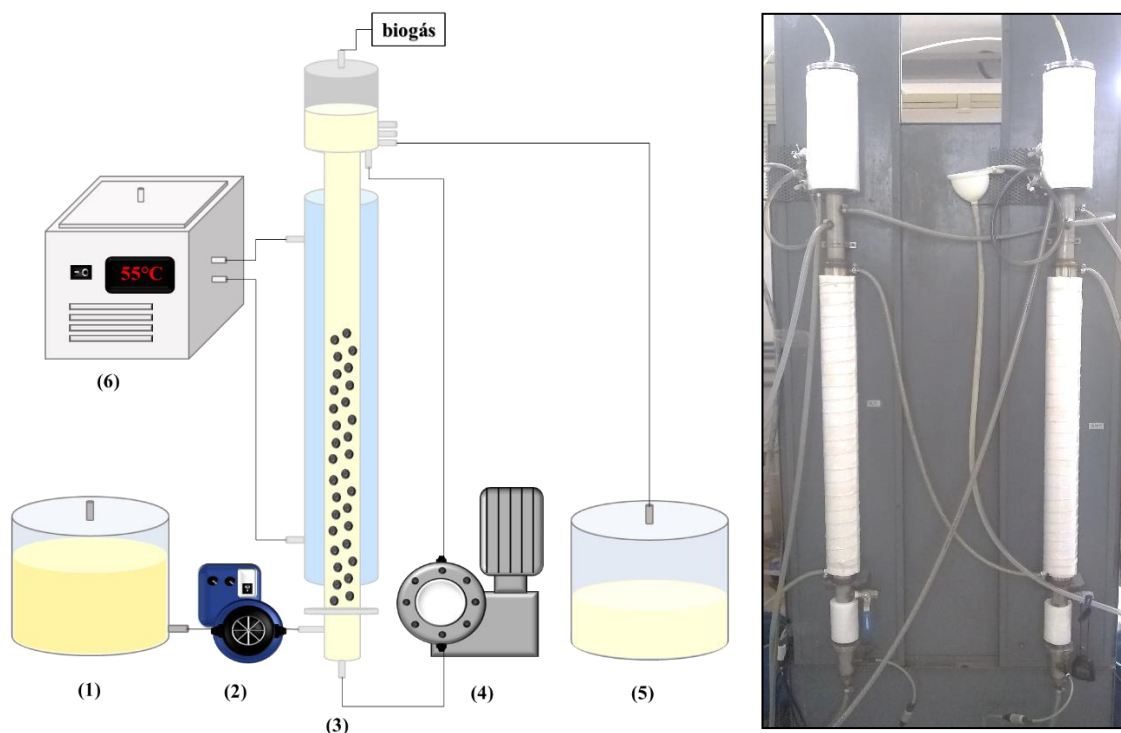


**Figura 8** – Materiais suportes utilizados nos reatores RALF. A) pneu triturado b) cinasita

Neste estudo foi avaliada a produção de  $\text{CH}_4$  em processo de estágio único e a produção sequencial de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  em processo dois estágios. Neste sentido, 4 reatores anaeróbios de leito fluidizado foram utilizados. Na produção sequencial, o efluente do reator acidogênico do primeiro estágio (RA-T) alimentou os reatores metanogênicos do segundo estágio (RS-T e RS-M). Assim, o aparato experimental constou de um reator acidogênico termofílico, dois reatores metanogênicos sequenciais (termofílico e mesofílico) e um reator metanogênico termofílico de estágio único. As Figuras 9 e 10 apresentam o esquema com a configuração do processo em dois estágios e o arranjo operacional.



**Figura 9** – Arranjo dos reatores acidogênico, metanogênico e sequenciais



**Figura 10** – Esquema do aparato experimental para produção de  $H_2$  e  $CH_4$ . (1) depósito afluyente, (2) bomba de alimentação (3) reator anaeróbico de leito fluidizado, (4) bomba de recirculação, (5) depósito efluyente e (6) banho termostático.

Como explicitado anteriormente, os reatores metanogênicos sequenciais foram operados em temperaturas diferentes a fim de verificar como a temperatura influencia na produção sequencial de metano. Dessa maneira, um reator metanogênico sequencial foi mantido a  $55^\circ C$  e outro a temperatura ambiente (temperatura média local de  $22^\circ C$  no período de operação). Apesar de nenhum dos substratos empregados serem lançados a alta temperatura, decidiu-se por avaliar o sistema termofílico devido aos melhores resultados produzidos nesta condição (COSTA et al., 2021; NIE et al., 2021). O controle da temperatura em  $55^\circ C$  foi realizado por meio de banho termostático. Para garantir a fluidização nos reatores, o efluente foi recirculado a uma velocidade 30% superior a mínima de fluidização.

### 3.2. Águas residuárias

Soro de queijo e glicerol foram os substratos utilizados neste trabalho. O soro de queijo avaliado foi produzido pela empresa LeiteSol<sup>®</sup> (Bragança Paulista – SP). Segundo a empresa, o soro de queijo em pó foi obtido por meio da evaporação e secagem por atomização do soro de queijo *in natura*. A composição do soro de queijo em pó é apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6** – Composição do soro de queijo em pó fornecido pela LeiteSol®

<b>Composição média em porção de 100 g</b>	
Valor energético	375 kcal = 1591 kJ
Carboidratos	76,5 g
Proteínas	11 g
Gorduras totais	1,5 g
Gorduras saturadas	0,72 g
Gorduras Monoinsaturadas	0,3 g
Gorduras Poliinsaturadas	0,03 g
Gorduras trans	0,03 g
Fibra alimentar	0
Colesterol	3,2 mg
CLA	0,01 g
Cinzas	Max. 6%
Umidade	Max. 3%
Acidez titulável (ácido láctico)	Máx. 0,16%
Índice de Insolubilidade (mL)	Max. 0,5%
Lactose	Min. 76,5%
Cálcio	650 mg
Sódio	450 mg

Fonte: LeiteSol®

O glicerol utilizado neste trabalho foi adquirido da Biobrotas Oleoquímica, localizada na cidade de Brotas – SP, sendo também denominado de glicerina bi-destilada, ou simplesmente, glicerina pura. Na Tabela 7 encontram-se algumas especificações do glicerol aplicado.



**Tabela 7** – Especificações técnicas do glicerol

<b>Especificações do glicerol</b>	
Teor de glicerol	Min. 99,5%
Teor de água	Máx. 0,5%
Gravidade específica a 20°C	1,26015
Cinzas	Máx. 0,01%
Teor de cloreto de sódio	Máx. 0,001%
Ácidos graxos e ésteres – mL de uma solução de NaOH 0,5N	Máx. 1 mL
pH, solução a 10% em água destilada	7,0 – 7,5

Fonte: Biobrotas Oleoquímica

Com o propósito de garantir os macronutrientes e micronutrientes necessário para que a digestão anaeróbia ocorresse de forma adequada, foi adicionado junto aos afluentes dos reatores meio nutricional proposto por Del Nery (1987), apresentado na Tabela 8, assim como realizado em outros trabalhos que usaram soro de queijo e glicerol como substrato (ROSA, 2014; LOPES, 2015; RAMOS, 2016; COSTA, 2017). Apesar da co-digestão auxiliar no balanço nutricional do afluente, optou-se pela adição do meio Del Nery para que o processo não fosse prejudicado por uma possível escassez ou quantidade insuficiente de algum nutriente.

**Tabela 8** – Meio nutricional proposto por Del Nery (1987)

<b>Composto</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Ureia	125,0
Sulfato de níquel	1,0
Sulfato ferroso	5,0
Cloreto férrico	0,5
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto de cobalto	0,08
Óxido de selênio	0,07
Fosfato de potássio monobásico	85,0
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Fosfato de sódio dibásico	33,4

### 3.3. Inóculo

Dois inóculos foram adotados na operação dos reatores de acordo com a temperatura empregada. Dessa forma, nos reatores termofílicos o inóculo utilizado foi o lodo granular anaeróbico termofílico de reator UASB usado no processamento de vinhaça de cana-de-açúcar da Usina São Martinho, localizada no município de Pradópolis, em São Paulo. No reator mesofílico, o inóculo consistiu no lodo anaeróbico mesofílico de reator UASB do tratamento de águas residuárias do abatedouro da avícola Dacar S/A, localizada no município Tietê, em São Paulo.

A fim de inibir a atividade das *archaeas* metanogênicas no reator acidogênico, o lodo termofílico foi submetido a um pré-tratamento térmico de acordo com a metodologia proposta por Kim et al. (2006). Neste pré-tratamento, o lodo foi mantido sob constante agitação para homogeneização do material, permanecendo por cerca de 10 min sob a temperatura de 90°C, sendo em seguida levado a um banho de gelo para ocorrência do choque térmico conforme indicado por Maintinguer et al. (2008). O lodo dos reatores metanogênicos não sofreu nenhum pré-tratamento.

### 3.4. Análises de monitoramento da operação

As análises de DQO, sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e pH foram realizadas de acordo com o APHA et al. (2012).

A determinação da concentração de carboidratos como lactose foi feita de acordo com o método colorimétrico proposto por Dubois et al. (1956) e a concentração de glicerol segundo o método colorimétrico proposto por Bondioli e Bella (2005).

A análise de ácidos orgânicos voláteis (AOV) foi realizada de acordo com Dilallo e Albertson (1961) e a determinação de alcalinidade bicarbonato (AB) conforme metodologia modificada de Ripley, Boyle e Converse (1986). Os metabólitos produzidos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida (HPLC Shimadzu) conforme apresentado em Penteado et al. (2013), e a concentração de 1,3-propanodiol (PDO) foi medida por cromatografia gasosa (GC-17<sup>a</sup>, Shimadzu, Japan) de acordo com Paranhos e Silva (2018).

A produção volumétrica de biogás foi determinada de acordo com o método empregado por Walker et al. (2009), no qual o volume de gás produzido é medido de acordo com o volume de solução salina acidificada (pH 2) expulso da proveta invertida.

A análise da composição do biogás foi feita por cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo da marca Shimadzu modelo GC-2010 equipado com detector de condutividade térmica, composto por uma coluna capilar Sigma-Aldrich modelo Carboxen 1010 Plot. As

temperaturas do injetor, detector e coluna foram respectivamente 220, 230 e 135°C, e o gás de arraste utilizado foi argônio. Amostras de 1 mL de biogás foram injetadas no equipamento por meio do uso de seringa *gas tigh*.

### 3.5. Análise da comunidade microbiana

As amostras de biomassa coletadas no RU-T (TCO de 5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), RA-T (TCO de 60, 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), e RS-T e RS-M (TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foram lavadas em tampão fosfato (PBSX1), centrifugadas a 6000 rpm e, posteriormente, os pellets de biomassa originados foram armazenados a -20°C. DNA foi extraído utilizando FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) de acordo com o procedimento proposto pelo fabricante. A concentração e pureza do DNA extraído foram medidos em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), e os tamanhos dos fragmentos DNA genômico determinados por Eletroforese em gel de agarose 0,8%. O sequenciamento e o serviço de bioinformática foram realizados pela empresa GenOne<sup>DX</sup> – Genética Avançada (Rio de Janeiro, Brasil). Os primers utilizados foram 341F/806R para o Domínio Bacteria (região V3+V4), e primers U519F/806R para o Domínio *Archaea* (região V4).

### 3.6. Cálculo dos indicadores de desempenho

A seguir serão apresentadas as equações utilizadas nos cálculos dos principais parâmetros estudados neste trabalho.

- Vazão de biogás no reator ( $Q_g$ )

A vazão de biogás no reator, Equação 22, corresponde ao volume de biogás produzido pelo reator em um determinado intervalo de tempo.

$$Q_g = \frac{v_m}{t} \quad [\text{mL.h}^{-1}] \quad (22)$$

sendo  $v_m$  o volume de biogás e  $t$  é o intervalo de tempo.

- Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e metano (PVM)

A produção volumétrica de hidrogênio/metano associa o volume de hidrogênio/metano produzido com o volume do reator em um determinado intervalo de tempo.

$$PVH = \frac{Q_g \times \%H_2}{V} \quad [\text{mL de H}_2\text{.L}^{-1}\text{h}^{-1}] \quad (23)$$

$$PVM = \frac{Q_g \times \%CH_4}{V} \quad [\text{mL de } CH_4 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}] \quad (24)$$

sendo  $\%H_2$  a porcentagem de  $H_2$  presente no biogás,  $\%CH_4$  a porcentagem de metano, e  $V$  é o volume total do reator.

- Taxa de carregamento orgânico (TCO)

A taxa de carregamento orgânico indica a carga orgânica aplicada ao reator em um determinado espaço de tempo.

$$TCO = \frac{DQO_A}{TDH} \quad [\text{gDQO} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}] \quad (25)$$

sendo  $DQO_A$  a DQO afluente e  $TDH$  o tempo de detenção hidráulica.

- Rendimento de hidrogênio (HY) e metano (MY)

O rendimento de hidrogênio/metano mede a quantidade de hidrogênio/metano gerados pela DQO aplicada ou consumida.

$$HY = \frac{n_{H_2}}{Q \times DQO_A} \quad [\text{mmol de } H_2 \cdot \text{g DQO}^{-1}_{\text{apli}}] \quad (26)$$

$$MY = \frac{Q_g \times \%CH_4 \times 24}{Q \times (DQO_A - DQO_E)} \quad [\text{mL de } CH_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}] \quad (27)$$

sendo  $n_{H_2}$  a produção molar de hidrogênio ( $\text{mmol } H_2 \cdot d^{-1}$ ),  $Q$  é a vazão média afluente ( $L \cdot d^{-1}$ ),  $DQO_A$  é a DQO afluente ( $\text{gDQO} \cdot L^{-1}$ ),  $Q_g$  é a vazão de biogás no reator ( $\text{mL} \cdot h^{-1}$ ),  $\%CH_4$  a porcentagem de metano e  $DQO_E$  é a DQO efluente ( $\text{gDQO} \cdot L^{-1}$ ). Os cálculos de rendimento foram realizados nas condições normais de temperatura e pressão.

- Potencial energético (PE)

O potencial energético indica a geração de energia em cada reator por unidade de tempo (dia) com base na produção volumétrica de  $H_2$  e  $CH_4$ .

$$PE_{H_2} = PVH \times 24 \times V \times \left( \frac{\rho_{H_2}}{1000} \right) \times PCI_{H_2} \quad [\text{kJ} \cdot d^{-1}] \quad (28)$$

$$PE_{CH_4} = PVM \times 24 \times V \times \left( \frac{\rho_{CH_4}}{10^6} \right) \times PCI_{CH_4} \quad [kJ.d^{-1}] \quad (29)$$

sendo PVH a produção volumétrica de hidrogênio (mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), PVM a produção volumétrica de metano (mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), V o volume do reator (L), ρ<sub>H<sub>2</sub></sub> é a densidade do H<sub>2</sub> (kg.L<sup>-1</sup>), ρ<sub>CH<sub>4</sub></sub> é a densidade do CH<sub>4</sub> (kg.m<sup>-3</sup>), PCI<sub>H<sub>2</sub></sub> é o poder calorífico inferior do hidrogênio (kJ.kg<sup>-1</sup>) e), PCI<sub>CH<sub>4</sub></sub> é o poder calorífico inferior do metano (kJ.kg<sup>-1</sup>). Considerou-se para tal o PCI do H<sub>2</sub> igual a 120905 kJ.kg<sup>-1</sup> e do CH<sub>4</sub> 50162,5 kJ.kg<sup>-1</sup> (NBR 15213).

### 3.7. Procedimento experimental

Inicialmente, os reatores foram operados em modo batelada para adaptação dos microrganismos e aderência no material suporte. Assim, o efluente foi recirculado por 23 dias em sistema fechado nos reatores metanogênicos, até que parâmetros como degradação dos substratos se tornaram estáveis (> 90 % nos reatores metanogênicos), e por 10 dias no reator acidogênico.

A concentração de substratos utilizada para adaptação da biomassa nos reatores metanogênicos foi de 2.000 mgDQO.L<sup>-1</sup>, sendo 1.000 mgDQO.L<sup>-1</sup> advindas do glicerol e 1.000 mgDQO.L<sup>-1</sup> do soro de queijo em pó. No reator acidogênico, a adaptação das bactérias ocorreu com a alimentação de 10.000 mgDQO.L<sup>-1</sup>, com a mesma proporção de substrato alimentada nos reatores metanogênicos (50% da DQO proveniente do glicerol e 50% do soro de queijo). Além dos substratos, compunham o afluente meio nutricional Del Nery (1987) e inóculo na concentração de 10% v/v, triturado e pré-tratado para o reator acidogênico e somente triturado, sem pré-tratamento, para o reator metanogênico. Para assegurar o meio anaeróbico, N<sub>2</sub> foi introduzido nos barriletes e no *head space* de cada reator por cerca de 10 min.

Após o período de adaptação, o sistema foi posto em modo contínuo. Dessa forma, este estudo foi dividido em seis fases com o objetivo de analisar como a concentração afluente de substratos afetou o processo. Uma fase foi encerrada após o sistema permanecer por algum tempo em regime estacionário, ou seja, mudanças no rendimento de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> se mantiveram inferiores a 20%.

Os barriletes de alimentação dos reatores foram compostos pela mistura soro de queijo e glicerol, juntamente com o meio nutricional proposto por Del Nery (1987). O pH afluente foi ajustado com soluções de NaOH 6 M e HCl 30% v/v, de acordo com o pH efluente dos reatores, os quais foram controlados para manter-se entre 4,0 – 4,5 no reator acidogênico e 7,0 – 8,5 nos

reatores metanogênicos. Bicarbonato de sódio ( $0,4 - 1,0 \text{ gNaHCO}_3 \cdot \text{gDQO}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ) foi adicionado ao afluente dos reatores metanogênicos para auxiliar no tamponamento do pH.

No reator acidogênico, a concentração de substrato variou de  $10.000 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $20.000 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ , conforme apresentado na Tabela 9, com proporção 1:1 (base DQO) entre soro de queijo e glicerol. Assim, para a concentração de  $10.000 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $5.000 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$  foi devido ao glicerol e  $5.000 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$  ao soro de queijo. O TDH foi fixado em 4 h de acordo com os resultados obtidos por Rosa (2014) e Ottaviano et al. (2017) para o soro de queijo.

Nos reatores metanogênicos, o TDH foi inicialmente fixado em 24 h e a concentração afluente variou de  $2.000 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $20.000 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ , seguindo a mesma proporção que o reator acidogênico (50% da carga orgânica advinda do soro e 50% do glicerol). Dessa maneira, a taxa de carregamento orgânico (TCO) foi analisada em 2, 5, 7,5, 10, 15 e  $20 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Após a determinação da concentração ótima, o reator metanogênico termofílico de fase única foi submetido à menores TDH: 20 e 16 h. Na Tabela 9 são apresentadas as condições operacionais de cada fase avaliada e na Figura 11 é apresentado um fluxograma que exhibe de forma resumida os principais procedimentos realizados neste trabalho.

As análises de monitoramento de produção de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  e comportamento dos reatores foram realizadas com frequência de três vezes por semana.

**Tabela 9** – Condições operacionais para os reatores acidogênico (RA-T), metanogênicos do processo em dois estágios (RS-T e RS-M) e metanogênico do processo em estágio único (RU-T)

RA-T			RS-T			RS-M			RU-T		
DQO		TCO	DQO		TCO	DQO		TCO	DQO		TCO
inicial	TDH (h)	(gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	inicial	TDH (h)	(gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	inicial	TDH (h)	(gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	inicial	TDH (h)	(gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
(mg/L)			(mg/L)			(mg/L)			(mg/L)		
10.000	4	60	2.000	24	2	2.000	24	2	2.000	24	2
15.000	4	90	5.000	24	5	5.000	24	5	5.000	24	5
20.000	4	120	7.500	24	7,5	7.500	24	7,5	7.500	24	7,5
			10.000	24	10	10.000	24	10	10.000	24	10
			15.000	24	15	15.000	24	15	15.000	24	15
			20.000	24	20	20.000	24	20	20.000	24	20
									10.000	20	12
									10.000	16	15





## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nesta pesquisa de acordo com o objetivo inicial, como degradação da matéria orgânica e dos substratos, produção volumétrica dos biocombustíveis hidrogênio e metano, rendimento de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, além da determinação da melhor configuração de operação dos reatores. Sendo assim, a apresentação dos resultados será dividida da seguinte forma: reator metanogênico termofílico de único estágio e, em seguida, serão apresentados os resultados da configuração dois estágios, ou seja, reator acidogênico e reatores metanogênicos sequenciais.

### 4.1. Processo em um estágio – Reator Metanogênico Termofílico (RU-T)

No reator metanogênico termofílico foram feitos dois estudos: um referente ao efeito da TCO pelo aumento da concentração afluyente, e o segundo, a respeito do efeito da TCO na produção de metano por meio de variações no TDH. A seguir serão apresentados e discutidos os resultados das duas abordagens.

#### 4.1.1. Influência da concentração de substratos no desempenho do RU-T

O reator RU-T foi mantido em operação por cerca de 532 dias para o estudo do efeito da TCO a partir da variação da concentração de substratos, sendo 71 dias na fase 1, 38 dias na fase 2, 137 dias na fase 3, 84 dias na fase 4, 95 dias na fase 5 e 107 dias na fase 6.

Como pode ser observado na Tabela 10, o pH do RU-T se manteve no intervalo 7,5 – 8,4, estando próximo a faixa ótima para metanogênese indicada pela literatura, entre 6 e 8 (CHERNICHARO, 2007). Verifica-se que o acréscimo na TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> alterou o pH do reator de 7,5 para 7,9. De maneira similar, constata-se um contínuo aumento do pH de 7,9 para 8,4 à medida que maiores quantidades de substrato foram adicionadas ao RU-T (5 gDQO.L<sup>-1</sup> para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>). Em seguida, ao atingir 15 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> observa-se oscilações no valor do pH, permanecendo em 8,1 na maior TCO.

**Tabela 10** – pH reacional, ácidos orgânicos voláteis e razão AI/AP do reator metanogênico RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Reator metanogênico termofílico - RU-T					
Fase	TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	pH	AOV (mgHAc.L <sup>-1</sup> ) (mínimo-máximo)	AI/AP (mínimo-máximo)
1	24	2	7,5 ± 0,3	133 - 714	0,53 – 1,67
2		5	7,9 ± 0,2	189 - 533	0,41 - 0,91
3		7,5	8,2 ± 0,2	89 - 466	0,21 - 0,48
4		10	8,4 ± 0,5	89 – 242	0,24 – 0,32
5		15	7,9 ± 0,3	284 – 1540	0,34 – 0,65
6		20	8,1 ± 0,5	267 – 1979	0,31 – 0,95

O soro de queijo é um substrato que apresenta em sua composição uma numerosa quantidade de C devido ao seu conteúdo de lactose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>). Por esse motivo, a decomposição deste substrato ocasiona o acúmulo de ácidos orgânicos no reator. Como o soro possui uma baixa alcalinidade, o pH do meio pode apresentar uma drástica queda, tornando-se um pH ácido (HASSAN; NELSON, 2012). Já o glicerol possui um pH alcalino, o qual pode ser associado à sua forma de fabricação. A reação de transesterificação para produção de biodiesel e glicerol consiste na reação de um triglicerídeo com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador. Os catalisadores básicos são os mais utilizados no meio industrial devido a maior rapidez e simplicidade, além de serem economicamente viáveis (RAMOS et al., 2011). De acordo com a Biobrotas, o pH do glicerol utilizado nesta pesquisa encontra-se entre 7,0-7,5. Dessa maneira, pode-se deduzir que as oscilações do pH de 7,5 para 8,4 apresentadas na co-digestão do soro de queijo com o glicerol no RU-T podem ser devido à atuação do glicerol. Como apontado por Rivero, Solera e Perez (2014) e Lovato et al. (2016), o glicerol age como um conveniente co-substrato devido ao pH apropriado para processos anaeróbios e a sua capacidade de tamponamento.

Apesar da capacidade de tamponamento do glicerol, foi adicionado bicarbonato de sódio ao afluente dos reatores na razão 0,4 – 1,0 g de NaHCO<sub>3</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>, baseando-se no trabalho de Siqueira (2008), com o objetivo de assegurar tamponamento do meio e evitar grandes alterações do pH. A partir da TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a quantidade de bicarbonato variou de 0,4 à 0,6 g de NaHCO<sub>3</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> devido a maior estabilidade apresentada pelo reator, apontada pelas menores razões AI/AP. A Tabela 10 contém as razões AI/AP e o valor dos ácidos orgânicos voláteis no efluente de cada fase do reator metanogênico.

O RU-T foi o reator metanogênico que acumulou as maiores concentrações de ácidos orgânicos voláteis (AOV) durante a operação, com concentração mínima de 89 mgHAc.L<sup>-1</sup> nas TCO de 7,5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, e máxima de 1979 mgHAc.L<sup>-1</sup>, ocorrido na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Devido às concentrações de ácidos produzidos pelo RU-T, 89 - 1979 mgHAc.L<sup>-1</sup>, este foi o reator metanogênico que apresentou as mais baixas remoções de DQO, com mínimo de 63,1% e máximo de 87,7%, como será detalhado na sequência do texto.

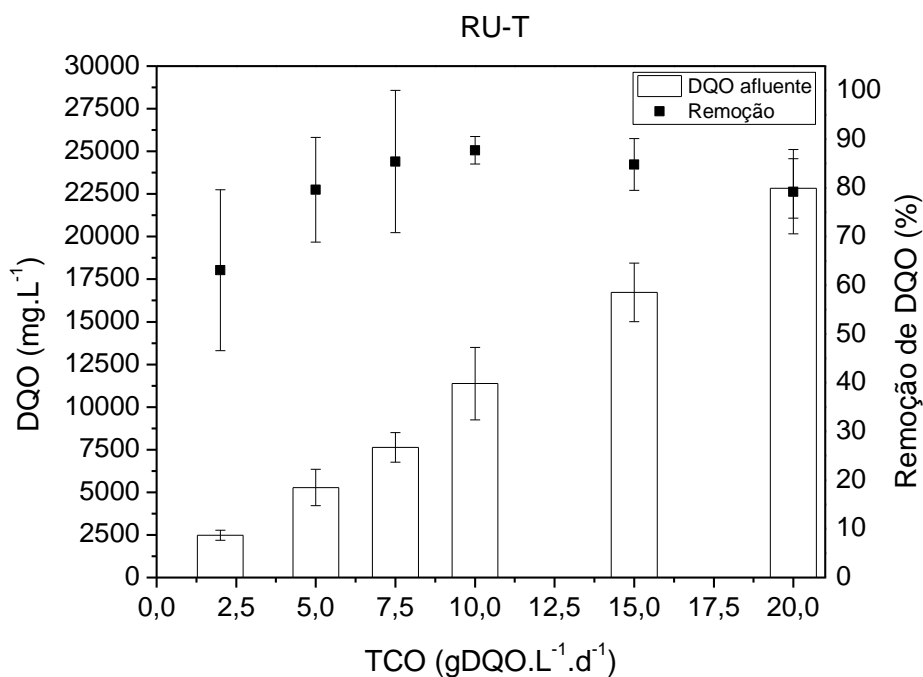
Com relação à alcalinidade, nota-se valores de AI/AP distantes do valor ideal igual a 0,3 proposto por Ripley, Boyle e Converse (1986), sendo a maior razão obtida na TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (0,5 – 1,7). O ajuste da razão AI/AP no RU-T passou a ocorrer no final da fase 1 e se manteve controlada durante as fases posteriores, estando próximo ao valor idealizado de 0,3 ao atingir a TCO de 7,5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (AI/AP de 0,21 a 0,48). No entanto, cabe ressaltar que este valor ideal que indica a estabilidade do sistema foi estimado para lodo de esgoto, podendo apresentar um valor ótimo distinto para diferentes substratos (KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019). Razão AI/AP abaixo de 0,3 foi indicada para tratamento mesofílico de esterco de galinha (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986) e fração orgânica de resíduos sólidos municipais (MARTÍN-GONZÁLEZ; FONT; VICENT, 2013), enquanto razão AI/AP de 0,4 e 0,9 demonstraram resultados satisfatórios de manutenção de AOV no tratamento de amido de batata (BALAGUER et al., 1992) e digestão termofílica de lodo de esgoto (FERRER; VÁZQUEZ; FONT, 2010), respectivamente. Embora elevadas concentrações de AOV tenham sido atingidas nas TCO de 15 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (267 a 1979 mgHAc.L<sup>-1</sup>), observa-se que a produção de ácidos graxos não causou impacto negativo na estabilidade do reator, como pode ser comprovado pelos intervalos de AI/AP e pH obtidos, 0,34-0,95 e 7,9-8,1.

As remoções de DQO e concentrações afluente do reator metanogênico termofílico (RU-T) são encontradas na Tabela 11 e Figura 12.

**Tabela 11** – DQO afluente e remoção de DQO no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Reator metanogênico termofílico – RU-T				
Fase	TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Concentração afluente (mgDQO.L <sup>-1</sup> )	Remoção de DQO (%)
1	24	2	2.482,2 ± 296,3	63,1
2		5	5.283,2 ± 1.070,6	79,6
3		7,5	7.634,8 ± 874,2	85,4
4		10	11.377,5 ± 2.125,9	87,7
5		15	16.728,4 ± 1.714,9	84,8
6		20	22.832,5 ± 1.743,3	79,2

Observa-se na Figura 12 que a remoção de DQO apresentou um crescimento contínuo de 63,1% para 87,7% com o aumento da TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Posteriormente, com a adição de maiores quantidades de substrato ao afluente, verifica-se uma queda na capacidade de remoção de DQO, diminuindo de 87,7% para 79,2% ao atingir 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Dessa forma, conclui-se que, para a co-digestão de soro de queijo e glicerol estudada no RU-T, aumentos gradativos na alimentação acima da TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> promoveram uma sobrecarga do reator devido ao excesso de substrato e proporcionaram o acúmulo de AOV.



**Figura 12** - DQO afluente e remoção de DQO no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>

Conforme exposto na Tabela 10, nas TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, verifica-se concentrações de AOV de até 1540 e 1979 mgHAc.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Observa-se que com o aumento da concentração de ácidos, a remoção de DQO diminuiu em 8,5% em pontos percentuais e o rendimento de metano apresentou uma queda de aproximadamente 38,5%. Este comportamento ocorre, pois, a velocidade de degradação dos ácidos pelas *archaeas* metanogênicas acaba sendo mais lenta do que a velocidade de produção proporcionada pelas bactérias acidogênicas, causando um desequilíbrio no meio reacional, resultando em uma menor produção de CH<sub>4</sub>. Outro fator que pode ter colaborado para acúmulo de AOV e, conseqüentemente, menor remoção de matéria orgânica, é a pressão parcial de hidrogênio, uma vez que uma elevação na pressão parcial de H<sub>2</sub> pode ter afetado bactérias acetogênicas e a conversão de ácidos de cadeias maiores (> C3) à ácido acético, e, posteriormente, à CH<sub>4</sub> (JO; KIM; LEE, 2016).

Avaliando os resultados fornecidos pela literatura com relação a remoção de DQO em reatores metanogênicos verifica-se uma considerável discrepância devido a diferentes fatores operacionais adotados, configuração de reatores e ao tipo de substrato empregado.

Como observado na Figura 12, o aumento da TCO de 2 para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> colaborou para a remoção da DQO, aumentando de 63,1% para 87,7%. Comportamento similar ocorreu no estudo de Barros, Duda e Oliveira (2016) utilizando vinhaça de cana-de-açúcar e reatores UASB mesofílicos, sendo estes operados em TCO entre 0,2 – 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (R1) e 0,2 – 11,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (R2). Assim, ao aumentar a TCO de 0,2–2,5 para 2,5–5,0 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o consumo médio de DQO alterou-se de 67% para 81% no R1 e de 69% para 82% no R2. Porém, ao aumentar a TCO acima dos valores descritos anteriormente os reatores começaram a apresentar ineficiência na remoção da matéria orgânica, da mesma forma como ocorreu com o RU-T, no qual ao ser submetido a TCO maiores do que 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a remoção de DQO decaiu de 87,7% para 79,2%. O mesmo efeito da TCO na remoção de matéria orgânica também foi constatado por Costa (2017) ao aumentar gradativamente a concentração de substrato utilizando TDH fixo em 24 h. Dessa forma, o consumo de DQO aumentou de 90,3% para 94% em função da mudança na TCO de 1 para 3 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, sendo posteriormente observada uma diminuição no consumo para 62,3% com a alimentação de 7 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Lovato et al. (2016) estudaram a co-digestão de soro de queijo e glicerina em AnSBBR mesofílico, e atestaram consumos de DQO entre 87 e 94% aplicando concentração de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>. A máxima remoção de DQO no RU-T foi de 87,7% exibida na concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>. Dessa maneira, verifica-se em Lovato et al. (2016) e no RU-T resultados

semelhantes, ainda que tenham sido adotados reatores distintos. A batelada sequencial utilizada por Lovato et al. (2016) apresentava um ciclo de 8 h, enquanto o RU-T foi mantido em TDH de 24 h. Além disso, a condição mesofílica empregada pelos autores pode ter sido outro fator que colaborou para um melhor aproveitamento da matéria orgânica.

Razaviarani e Buchanan (2015) utilizando reatores CSTR mesofílicos (37°C) para a co-digestão de lodo de esgoto municipal e glicerina de resíduo de biodiesel observaram remoção de DQO equivalente a 60,3% ao adicionar 1,35% v/v de glicerina, sendo este resultado cerca de 1,46 vezes maior do que o consumo no reator controle. Os autores empregaram um tempo de retenção de sólidos (SRT) de 20 d, o que pode não ter sido suficiente para aclimação adequada dos microrganismos, e por isso a baixa remoção de DQO. Zahedi et al. (2018) estudando a co-digestão de lodo de esgoto e glicerina verificaram remoção de 65% da DQO total ao utilizar SRT de 20 d em reator semi-contínuo com agitação, e decréscimo para 4-10% de remoção de DQO em SRT de 5 d, reforçando a idéia da aplicação de SRT insuficiente, uma vez que na utilização de baixos SRT o tempo de crescimento microbiológico não compensa a remoção dos microrganismos suspensos (APPELS et al., 2008). O reator RALF adotado nesta pesquisa foi utilizado com tempo de detenção hidráulica de 24 h, estando os microrganismos imobilizados no material suporte, permitindo assim melhor adaptação da biomassa.

Observou-se que o RU-T atingiu sua capacidade máxima de remoção de DQO na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, e, de forma análoga ao apresentado nos trabalhos de Razaviarani e Buchanan (2015), Barros, Duda e Oliveira (2016) e Costa (2017), o acréscimo contínuo da TCO afetou negativamente o reator, prejudicando a remoção de matéria orgânica, indicando uma possível inibição dos microrganismos pelo excesso de substrato no meio e acúmulo de ácidos orgânicos voláteis. No entanto, as remoções de matéria orgânica apresentadas neste estudo (79,2-87,7%) estão de acordo com remoções entre 40-98% reportadas na digestão anaeróbia de soro de queijo em RALF mesofílico (KARADAG et al., 2015) e com remoção de DQO de 51,9-94,2% verificada na mono-digestão de glicerol em RALF termofílico utilizando TCO de 1,2-7,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (COSTA et al., 2021). Comparando os resultados da mono digestão de glicerol em RALF termofílico (COSTA et al., 2021) com os resultados deste estudo, é possível observar como a co-digestão com o soro de queijo foi mais eficiente para o processo, uma vez que, a remoção de matéria orgânica no RU-T se manteve estável (79,2 – 87,7%) aplicando elevadas TCOs (5 – 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), enquanto a mono digestão de glicerol variou de 94,2% em 3,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 69,2% em 7,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (COSTA et al., 2021).

Por meio dos dados experimentais observados neste estudo foi possível ajustar uma equação empírica para descrever o perfil de remoção de DQO em função da TCO. Assim, a Equação 30 foi obtida com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9984.

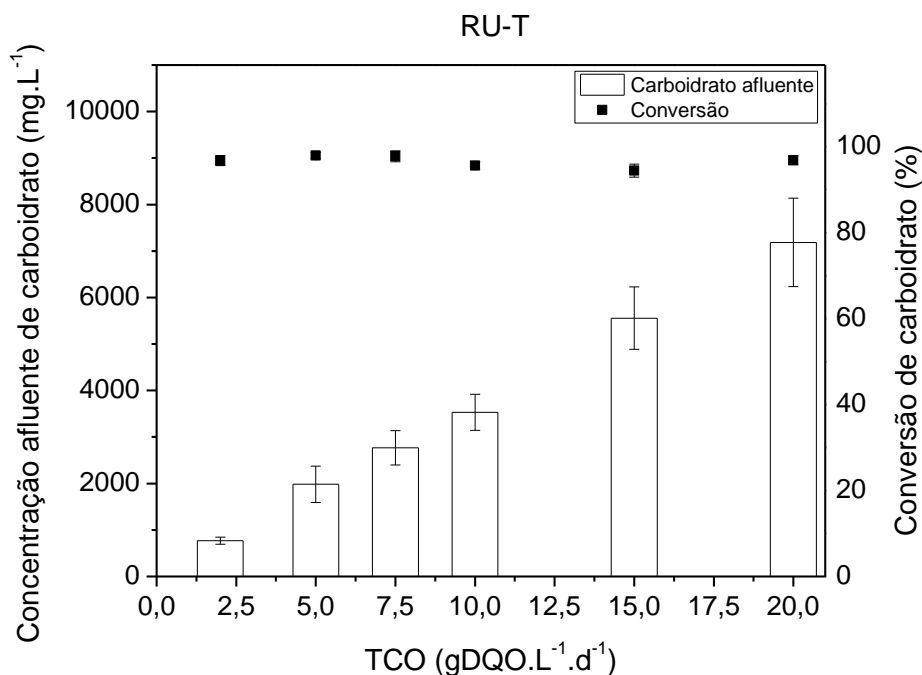
$$\text{Remoção de DQO} = 0,014.(TCO)^3 - 0,6692.(TCO)^2 + 9,3736.(TCO) + 47,116 \quad (30)$$

O ponto de máximo da Equação 30 foi determinado na TCO 10,4 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto o ponto de mínimo foi em 21,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o qual se encontra fora do intervalo utilizado neste estudo. Ressalta-se que essa equação só é válida para as condições aplicadas no RU-T, ou seja, TCO entre 2 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Com relação à conversão de carboidratos, de acordo com os resultados fornecidos na Tabela 12 e Figura 13, o RU-T demonstrou elevada capacidade de conversão independente da TCO adotada, atingindo valores superiores a 90% em todas as TCO, de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

**Tabela 12** – Concentração afluyente e conversão de carboidratos no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

<b>Reator metanogênico termofílico – RU-T</b>				
<b>Fase</b>	<b>TDH (h)</b>	<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração afluyente de carboidrato (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conversão de carboidrato (%)</b>
<b>1</b>	24	2	769,5 ± 78,8	96,8
<b>2</b>		5	1.984,7 ± 391,2	98,0
<b>3</b>		7,5	2.765,1 ± 369,2	97,8
<b>4</b>		10	3.531,3 ± 386,7	95,6
<b>5</b>		15	5.555,7 ± 670,8	94,4
<b>6</b>		20	7.185,7 ± 952,9	96,9



**Figura 13** – Concentração inicial de carboidratos totais e conversão de carboidrato no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>

A única fonte de carboidratos da alimentação do reator provém do soro de queijo, e, sabe-se que, a lactose (principal carboidrato do soro de queijo) é facilmente degradada pelos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia, e, portanto, permite elevadas conversões de carboidrato em produtos e subprodutos do processo. A adição de glicerol à alimentação contendo soro de queijo não prejudicou a atividade dos microrganismos com relação a conversão dos carboidratos, como pode ser visto devido aos consumos maiores do que 90%. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o observado por Lovato et al. (2016) ao empregar a co-digestão de soro de queijo e glicerina para produção de biometano, no qual conversões de carboidrato superiores a 95% foram obtidas para TCO entre 7,5 – 7,9 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

De maneira análoga ao comportamento exibido para conversão de carboidratos, o RU-T apresentou um elevado aproveitamento do glicerol, com conversões acima de 95% em todas as TCO aplicadas. Assim, ao aumentar a TCO de 2 para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a conversão do glicerol no RU-T apresentou um acréscimo de 95,8% para 99,3%. As concentrações de glicerol no afluente e conversões alcançadas no reator para as demais TCO estão expostos na Tabela 13 e Figura 14.



**Tabela 13** – Concentração afluyente e conversão de glicerol no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

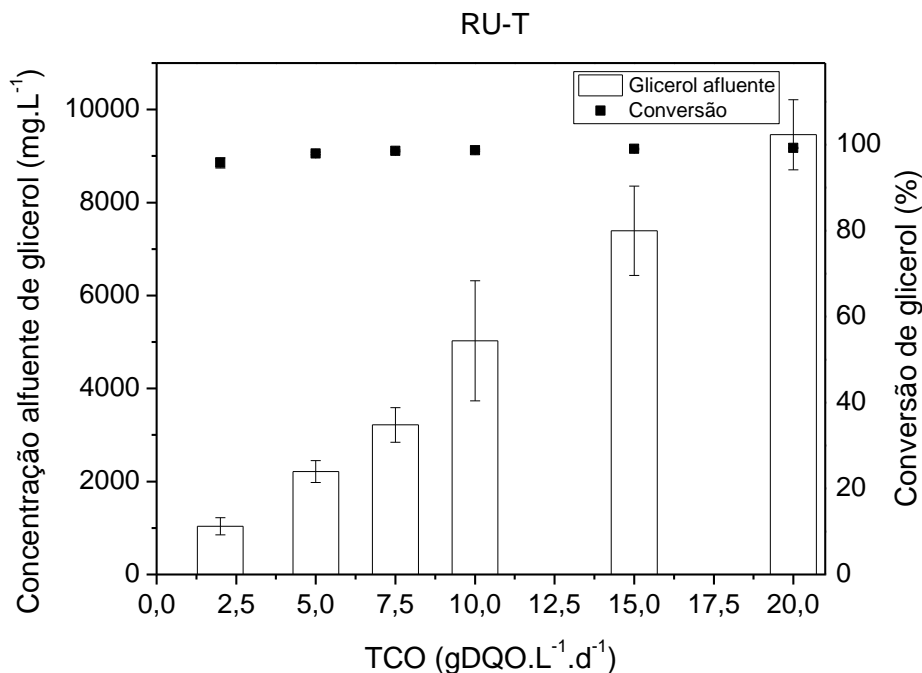
<b>Reator metanogênico termofílico – RU-T</b>				
<b>Fase</b>	<b>TDH</b>	<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração afluyente de glicerol (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conversão de glicerol (%)</b>
<b>1</b>	24	2	1.036,0 ± 185,5	95,8
<b>2</b>		5	2.213,1 ± 237,5	98,0
<b>3</b>		7,5	3.216,3 ± 374,0	98,5
<b>4</b>		10	5.026,3 ± 1.291,1	98,7
<b>5</b>		15	7.392,5 ± 962,8	99,0
<b>6</b>		20	9.459,4 ± 753,1	99,3

Por ser tratar de um substrato de fácil degradação e adaptação dos microrganismos, foi possível atingir com o glicerol uma alta conversão nas duas configurações empregadas: operação em estágio único e em dois estágios.

Consumos superiores a 90% também foram observadas por Costa (2017) estudando a digestão anaeróbia de glicerol nas TCO de 1 – 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em reator RALF. Somente quando a TCO adotada foi de 40 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a conversão de glicerol foi inferior a 90%, igualando-se a 78,3%. Dessa maneira, as conversões observadas por Costa (2017) estão em concordância com os resultados verificados no reator metanogênico, com elevados consumos de glicerol nas TCO similares (>90%).

Zhang et al. (2015) operando reator CSTR sob condição hipertermofílica para degradação de glicerol e obtenção de metano e acetato também verificaram conversão de glicerol superior a 90% em todas as concentrações estudadas (5 – 13 g.L<sup>-1</sup> de glicerol) utilizando cultura mista de microrganismos.

Assim como Zhang et al. (2015) e Costa (2017), Vlassis et al. (2013) observaram conversões de glicerol maiores do que 90% para digestão anaeróbia de glicerol sob condição mesofílica operando reator CSTR com concentração entre 5 – 10 g.L<sup>-1</sup> e reator PABR entre 10 – 37,5 g.L<sup>-1</sup>.



**Figura 14** – Concentração inicial e conversão de glicerol no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>

Dessa forma, pode-se observar na literatura um elevado consumo de glicerol ao realizar o processo de digestão anaeróbia aplicando diferentes reatores e concentrações, com conversões acima de 90%, estando o trabalho apresentado de acordo com o esperado.

#### 4.1.1.1. Rendimento e produção volumétrica de metano no RU-T

O rendimento de metano de cada reator nas fases estudadas foi calculado com base no volume de CH<sub>4</sub> produzido por unidade de massa de DQO consumida. Em todos os reatores, o biogás produzido foi composto por CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

Na Figura 15 e Tabela 14 encontram-se o rendimento juntamente com o conteúdo de CH<sub>4</sub> no biogás, obtidos nas diferentes TCO aplicadas no RU-T. Ao longo da operação, o RU-T foi o reator que mais produziu ácidos orgânicos voláteis, como já discutido anteriormente. No entanto, este acúmulo de ácidos não chegou a ser prejudicial para o rendimento e conteúdo de metano, com exceção apenas das TCO mais elevadas, 15 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os valores de rendimento de CH<sub>4</sub> e composição do biogás são similares àqueles atingidos nos reatores metanogênicos sequenciais, os quais serão discutidos mais adiante.

O menor rendimento verificado no RU-T foi 143,4 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.cons, o qual ocorreu na TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. O acréscimo na carga orgânica inserida no reator favoreceu o rendimento de CH<sub>4</sub>. Sendo assim, na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi observado rendimento de

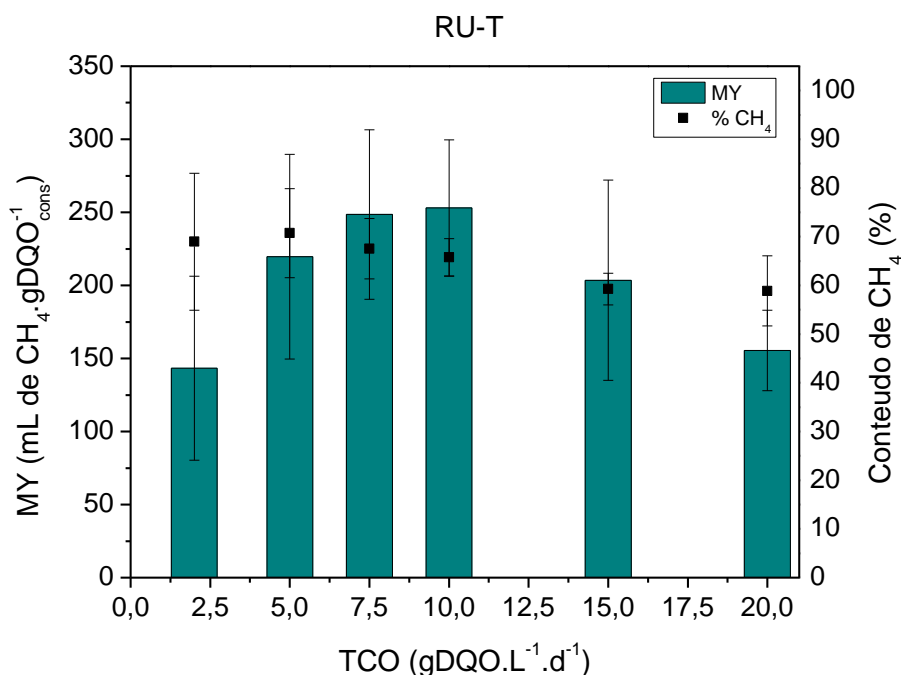
253,0 mL de  $\text{CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ , correspondendo a um incremento de 76,4% em relação ao rendimento exibido na TCO de 2  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . A partir da TCO de 10  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  o rendimento de  $\text{CH}_4$  começou a decair, fornecendo ao final da operação 155,5 mL de  $\text{CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ , o que correspondeu a uma queda de 38,5%.

Todavia, para a composição de biogás, comportamento inversamente proporcional foi observado, ou seja, a TCO de 20  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  resultou no menor conteúdo de  $\text{CH}_4$ , igual a 58,9%, enquanto a TCO de 5  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  exibiu biogás composto por 70,7% de  $\text{CH}_4$ . Esta redução na porcentagem de  $\text{CH}_4$  (% $\text{CH}_4$ ) com acréscimo na TCO está de acordo com trabalhos da literatura (JO; KIM; LEE, 2016; COSTA et al., 2021) e pode ser explicada pelo aumento na produção de ácidos orgânicos, e, conseqüentemente, aumento na produção de  $\text{CO}_2$ . Além disso,  $\text{CO}_2$  é consumido junto a  $\text{H}_2$  por microrganismos hidrogenotróficos para produção de  $\text{CH}_4$ , no entanto, é possível que esses microrganismos hidrogenotróficos tenham sido afetados pelas altas concentrações de AOV, e conseqüentemente, consumido menores quantidades de  $\text{CO}_2$ . O conteúdo e rendimento de  $\text{CH}_4$  para todas as TCO aplicadas no RU-T podem ser visualizados na Tabela 14 e Figura 15.

**Tabela 14** – Rendimento de metano e composição do biogás produzido no RU-T nas TCO de 2 a 20  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e TDH de 24 h

Fase	TDH (h)	TCO ( $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	MY (mL de $\text{CH}_4 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ )	% $\text{CH}_4$ no biogás (%)
1	24	2	143,4 ± 63,0	69,0 ± 14,1
2		5	219,6 ± 70,0	70,7 ± 9,1
3		7,5	248,5 ± 56,0	67,5 ± 6,2
4		10	253,0 ± 46,6	65,8 ± 3,8
5		15	203,5 ± 68,5	59,3 ± 3,3
6		20	155,5 ± 27,5	58,9 ± 7,2

MY: rendimento de metano



**Figura 15** – Rendimento de metano e conteúdo de CH<sub>4</sub> no biogás produzido no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Analisando os resultados obtidos, pode-se concluir que a estratégia de aumentar a TCO por meio de acréscimos na concentração de substrato e fixação do TDH, dentro da faixa estudada, beneficiou a produção de metano até a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Após 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a adição de matéria orgânica no RU-T comprometeu o rendimento de biogás, possivelmente devido ao acúmulo de AOV, uma vez que as concentrações de substratos mais elevadas chegaram a apresentar acúmulos aproximadamente 6 vezes (15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e 8 vezes (20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) superiores as concentrações de AOV em 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Este comportamento está em conformidade com reportado em demais trabalhos da literatura que estudaram a digestão anaeróbia de soro de queijo e glicerol e apresentaram menores rendimentos em decorrência de acúmulo de ácidos orgânicos voláteis (VLASSIS et al., 2013; TREU et al., 2019). Baba et al. (2013) estudando a co-digestão de lodo de fábrica de macarrão e glicerol bruto em temperatura de 35°C, observaram que o aumento das cargas de glicerol favoreceram o rendimento de CH<sub>4</sub> até o carregamento de 1,48 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, no qual 358 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> foram produzidos, e que acima da TCO de 1,48 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ocorreu um acúmulo de ácidos graxos, principalmente ácido propiônico, prejudicando o rendimento de CH<sub>4</sub>. Assim como Baba et al. (2013), Jo, Kim e Lee (2016) investigando a digestão anaeróbia de soro de queijo identificaram um aumento no rendimento de metano ao variar a TCO de

0,8 para 1,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, gerando 0,34 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. Porém, com o contínuo aumento da TCO até 4 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, foi exibido um declínio no rendimento de CH<sub>4</sub> para o valor mínimo de 0,28 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. Verifica-se que os rendimentos apresentados por Baba et al. (2013) e Jo, Kim e Lee (2016) são maiores do que os rendimentos entre 0,143 e 0,253 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> obtidos no RU-T. No entanto, as TCO entre 0,8 e 4,0 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> utilizadas pelos autores foram menores do que as adotadas nesta pesquisa, 2,0 – 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Observa-se no estudo de Jo, Kim e Lee (2016) que apesar das menores TCO em relação as taxas aplicadas no RU-T, as concentrações de substrato entre 4 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup> impostas pelos autores se assemelham as adotadas neste trabalho, 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>. Entretanto, o TDH foi fixado em 5 dias, enquanto no RU-T adotou-se um TDH de 24 h. Dessa maneira, observa-se como a TCO aplicada influencia no rendimento de CH<sub>4</sub>. Por outro lado, ao observar a remoção de DQO, verifica-se comportamento similar ao apresentado neste trabalho, com remoções máximas próximas a 80% (concentração de 12 gDQO.L<sup>-1</sup>), e posterior decaimento de eficiência para cerca de 60% ao submeter o reator a concentração de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>. Dessa forma, pode-se pressupor que a produção de metano está mais fortemente ligada a TCO aplicada, enquanto a remoção de DQO na digestão anaeróbia do soro de queijo é limitada pela concentração de substrato.

A co-digestão de soro de queijo e glicerol avaliada neste estudo produziu rendimento médio de 253,0 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub> ao ser aplicada a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no RU-T. Como discutido anteriormente, a co-digestão pode apresentar vantagens com relação ao balanço nutricional, diluição de compostos tóxicos e favorecer a produção de metano. Rasit et al. (2019) constataram incremento de 35,7% no rendimento de metano em relação ao rendimento da mono-digestão, ao aplicar a co-digestão de resíduo de caixa de gordura e glicerol a 1% v/v, obtendo 0,19 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na TCO de 2,2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Astals et al. (2011) verificaram aumento de 125% na produção de metano ao aplicar a co-digestão de estrume de porco e glicerol. Castrillón et al. (2011) observaram incremento de 400% na produção de biogás na co-digestão de estrume de gado e glicerol ao comparar com os resultados da mono-digestão de estrume de gado. No entanto, a junção de dois ou mais substratos também pode ser prejudicial para o processo dependendo do tipo de substrato escolhido. Nuchdang e Phalakornkule (2012) estudando a digestão anaeróbia de glicerol pré-tratado na TCO de 1,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> observaram rendimento de 0,32 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, e na co-digestão de glicerol com estrume de porco na TCO de 1,3 – 1,7 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> observaram 0,15 L de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. Verifica-se dessa maneira que a co-digestão do glicerol com estrume

de porco não foi conveniente para produção de metano, e que a mono-digestão foi mais apropriada.

Conforme descrito anteriormente, 50% da DQO imposta no reator metanogênico provém do glicerol. Assim, o RU-T produziu o maior rendimento na concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>, com 5 gDQO.L<sup>-1</sup> advinda do glicerol. Costa et al. (2021) estudaram a digestão anaeróbia de glicerol bruto em reator RALF a 55°C aplicando TDH de 24 h e observaram rendimento de 330,8 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na concentração de 3 gDQO.L<sup>-1</sup>. Comparando o resultado obtido por Costa et al. (2021) e o exibido no RU-T, observa-se que, apesar dos dois trabalhos terem aplicado condições semelhantes (inóculo, reator e temperatura), o RU-T suportou maior concentração de glicerol do que o reator avaliado por Costa et al. (2021). Tal fato pode estar associado ao emprego da co-digestão, e dos efeitos sinérgicos ocasionados neste tipo de processo. Outro indicativo da maior estabilidade que a co-digestão de soro e glicerol proporciona é a quantidade de alcalinizante utilizada no RU-T, que foi 0,4-0,6 gNaHCO<sub>3</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> para TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto para a mono-digestão de glicerol foi necessário 1,0 gNaHCO<sub>3</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> para neutralização dos ácidos e controle do pH aplicando TCO 3.53 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (COSTA et al., 2021). Entretanto, Costa et al. (2021) utilizaram glicerol bruto, enquanto este trabalho utilizou glicerol com grau de pureza próximo a 99,5%. Apesar da mono-digestão do glicerol ter exibido maior rendimento (330,8 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>) (COSTA et al., 2021) do que a co-digestão de soro de queijo e glicerol (253,0 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>), observa-se que a co-digestão apresenta maior tolerância a utilização de TCO elevadas.

Quando utilizado como co-substrato, o glicerol tem proporcionado incrementos na produção de metano devido a sua capacidade de tamponamento e pH adequado para digestão anaeróbia. Lovato et al. (2019) utilizaram glicerol como co-substrato na co-digestão com vinhaça de cana de açúcar e observaram rendimento de 15,30 mol CH<sub>4</sub>.kgDQO<sup>-1</sup> com a adição de 1,53% v/v de glicerol no afluente. Os autores concluíram que a junção deste co-substrato com a vinhaça acarretou benefícios para o processo e tratou de forma mais eficiente este resíduo que apresenta uma elevada quantidade de matéria orgânica e compostos recalcitrantes. Ao aplicar a co-digestão de soro de queijo e glicerol em reator AnSBBR sob taxa de carregamento orgânico de 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, Lovato et al. (2016) alcançaram rendimento de 13,3 mol de CH<sub>4</sub>.kgDQO<sup>-1</sup>. No RU-T, utilizando a co-digestão de soro de queijo e glicerol, 11,3 mol de CH<sub>4</sub>.kgDQO<sup>-1</sup> foi produzido. Assim, atesta-se que os rendimentos de metano verificados por Lovato et al. (2019) e por Lovato et al. (2016) foram maiores do que o observado nesta pesquisa. No entanto, os autores aplicaram temperatura na faixa mesofílica

(30°C) e uma proporção de glicerol mais elevada do que a utilizada neste estudo (0,8% v/v). Além disso, o processo foi realizado em reator AnSBBR, enquanto no RU-T foi utilizado reator do tipo RALF.

O reator batelada sequencial utilizado por Albuquerque, Ratusznei e Rodrigues (2019) e Sousa et al. (2019) também apresentou resultados superiores ao observado no reator RALF aplicado nesta pesquisa. Ambos os autores estudaram a co-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo e constataram rendimento de 15,3 mol de  $\text{CH}_4.\text{kgDQO}^{-1}$  e 15,76 mol de  $\text{CH}_4.\text{kgDQO}^{-1}$ , respectivamente. Como descrito anteriormente, o RU-T forneceu 11,3 mol de  $\text{CH}_4.\text{kgDQO}^{-1}$ . Aqui destaca-se que a TCO aplicada por Albuquerque, Ratusznei e Rodrigues (2019) e Sousa et al. (2019) foi de 25  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e 15  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , sendo estas maiores do que a do RU-T, 10  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Dessa maneira, verifica-se que o reator batelada sequencial foi capaz de tratar maior carga orgânica do que o reator metanogênico desta pesquisa, fornecendo rendimentos 35,4% e 39,5% superiores.

Analisando os trabalhos citados da literatura, é possível observar a influência da TCO sobre o rendimento de metano. Com exceção dos trabalhos de Albuquerque, Ratusznei e Rodrigues (2019), Sousa et al. (2019) e Lovato et al. (2016), os demais trabalhos citados no qual o rendimento de metano foi superior ao exibido no RU-T apresentaram TCO de até 4  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , indicando que a aplicação de baixas taxas de carregamento são mais apropriadas para obtenção de elevados rendimentos. Neste trabalho, os melhores resultados não ocorreram nas menores faixas de TCO aplicadas (2 e 5  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), e sim nas faixas intermediárias (7,5 e 10  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). No entanto, o rendimento de 253 mL de  $\text{CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$  alcançado neste estudo foi próximo aos valores observados na literatura, sendo aproximadamente 72,3% do valor teórico (350 mL de  $\text{CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) nas condições normais de temperatura e pressão. A utilização do reator RALF pode ter sido um dos fatores que permitiu eficientes resultados nas faixas intermediárias de TCO, já que uma das características do RALF é a utilização de elevadas TCO sem que ocorra perda da eficiência do processo (RAMOS; SILVA, 2020). Tal fato se deve à configuração do RALF, que é um reator de biomassa imobilizada, porém de leito móvel. De acordo com Campos (1999), a mobilidade das partículas possibilita maior contato do substrato com a biomassa, além de evitar problemas de colmatação e zonas mortas dentro do reator. O tamanho das partículas também favorece a operação, pois aumenta a superfície de contato para degradação dos substratos. Além disso, o processo de transferência de massa por difusão que ocorre através do biofilme formado no material suporte é facilitado pela pequena espessura do filme (CAMPOS, 1999). Assim, verifica-se que a TCO ótima deste estudo utilizando RALF termofílico (10  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) foi superior as suportadas

em demais reatores anaeróbios que utilizaram soro de queijo e/ou glicerol, como por exemplo SBR (4,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) (FERNÁNDEZ et al., 2015), DanF (0,8-4,0 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) (JO; KIM; LEE, 2016), PABR (1,0 – 3,8 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) (VLASSIS et al., 2013), AnSBBR (7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) (Lovato et al. 2016), EGSB (7,8 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) (CRUZ-SALOMÓN et al., 2020) e CSTR (2,4 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) (LEMBO et al., 2021).

Assim como foi feito com a remoção de DQO, uma equação empírica (Equação 31) foi estimada para descrever o comportamento do rendimento de metano (MY) em função da TCO para o intervalo de 2 à 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

$$MY = 0,089.(TCO)^3 - 4,1196.(TCO)^2 + 51,821.(TCO) + 54,571 \quad (31)$$

A Equação 31 apresentou R<sup>2</sup> = 0,9981 e o ponto de ótimo para maximização do rendimento de metano foi 8,8 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto o ponto de mínimo foi em 22,06 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Comparando as Equações 30 e 31, verifica-se TCO próximas para os pontos de ótimo da remoção de DQO (10,4 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e rendimento (8,8 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>).

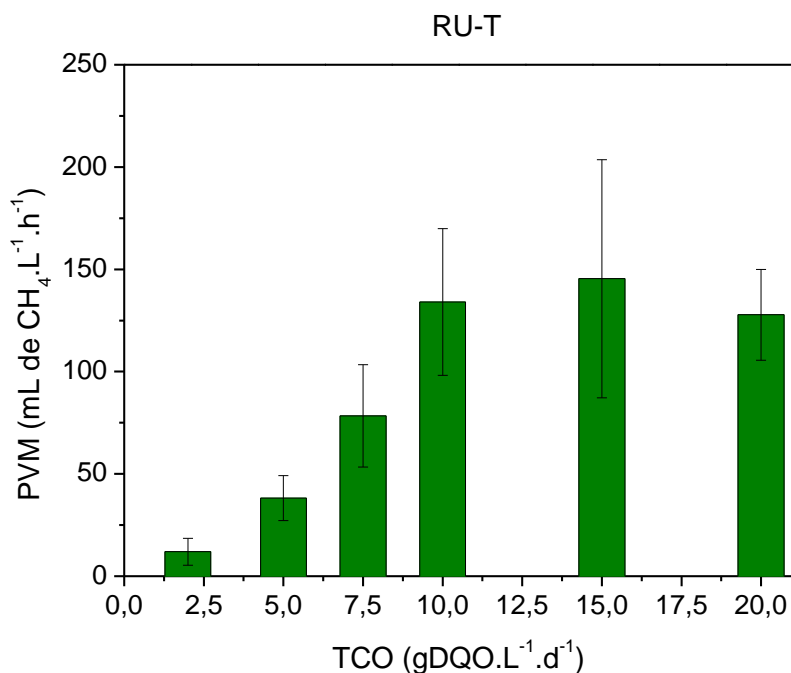
A produção volumétrica de metano (PVM) também foi analisada, com os valores correspondentes as diferentes TCO estudadas apresentados na Tabela 15 e Figuras 16.

**Tabela 15** – Produção volumétrica de metano obtida no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Fase	TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	PVM (mL de CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
1	24	2	12,0 ± 6,6
2		5	38,2 ± 11,0
3		7,5	78,4 ± 25,0
4		10	134,1 ± 35,9
5		15	145,4 ± 58,2
6		20	127,8 ± 22,2

PVM: produção volumétrica de metano





**Figura 16** – Produção volumétrica de metano observada no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Na menor TCO aplicada, 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o RU-T exibiu PVM equivalente a 12,0 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Ao aumentar a TCO, foi observado um crescimento contínuo da PVM até chegar a 145,4 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> na TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Ao atingir a TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o RU-T apresentou uma queda de 12,1% na produção volumétrica em relação a PVM obtida com 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, fornecendo 127,8 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Assim, verifica-se que o ponto de máximo da PVM exibido na Figura 16 foi numa fase diferente da que ocorreu o ponto de máximo para remoção de DQO e rendimento de metano no RU-T, sendo a PVM da TCO 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (fase 5) aproximadamente 8,4% superior a PVM da TCO 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (fase 4).

Assim como ocorreu neste estudo, Jo, Kim e Lee (2016) observaram acréscimos na produção volumétrica de metano em decorrência do aumento da TCO, obtendo PVM entre 179 – 589 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os autores também fixaram o TDH (5 d) e variaram a concentração (4 – 20 gDQO.L<sup>-1</sup>), fornecendo TCO correspondentes à faixa 0,8 – 4,0 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. As concentrações e o TDH aplicados por Jo, Kim e Lee (2016) foram superiores aos valores adotados neste trabalho, além disso, o reator utilizado foi do tipo filtro anaeróbio empacotado de fluxo descendente (DAnF), operado à 35°C. Ferraz Junior et al. (2016) estudando a digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em reator UASB termofílico, observaram incremento de 52,6% na produção de metano em decorrência da variação da TCO de 15 para

25 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, obtendo 87,9 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Os autores não verificaram perda de eficiência na PVM em função de acréscimos na TCO.

Como discutido anteriormente, o reator RALF utilizado neste trabalho para avaliar a co-digestão de soro de queijo e glicerol produziu 145,4 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ou 130 mol de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Neste tipo de reator podem ser utilizadas altas taxas de carregamento orgânico sem que ocorra perda de eficiência, devido à imobilização da biomassa realizada nas partículas de inertes presentes dentro do reator e aos elevados coeficientes de transferência de massa proporcionados (MAO et al., 2015). Utilizando reator AnSBBR mesofílico para estudar a co-digestão de soro de queijo e glicerol, Lovato et al. (2016) verificaram produção volumétrica 21,7% inferior a observada neste trabalho, produzindo 101,8 mol de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Avaliando a mono-digestão da glicerina e do soro de queijo, os autores obtiveram 78,7 e 93,7 mol de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, indicando que a co-digestão é uma boa estratégia no tratamento e recuperação energética desses dois subprodutos, uma vez que maiores produções de metano foram alcançadas.

Vlassis et al. (2013) utilizaram reator CSTR e observaram PVM de 0,074 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> na digestão de glicerol aplicando 0,25 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em condição mesofílica, porém ao utilizarem reator PABR na TCO de 3 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a PVM passou a ser 0,993 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. No entanto, as condições impostas nos reatores foram divergentes, com concentrações de 5 – 10 gDQO.L<sup>-1</sup> e TDH de 20 d no reator CSTR e de 10 – 37,5 gDQO.L<sup>-1</sup> e TDH de 10 d no reator PABR.

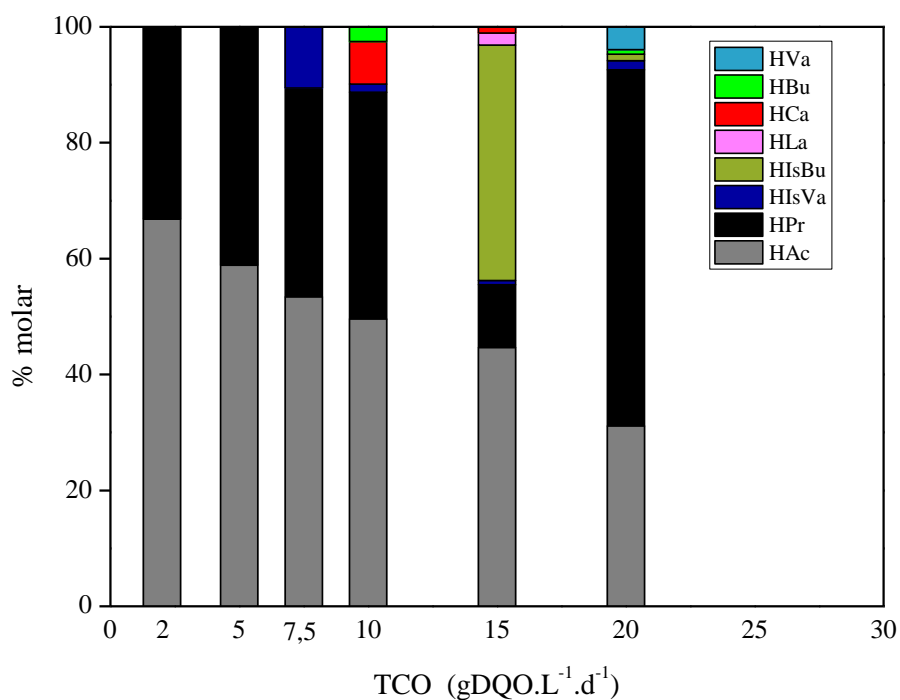
Costa et al. (2021) utilizaram reator RALF termofílico para investigar a digestão anaeróbia de glicerol e verificaram PVM de 2,04 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> na TCO de 7,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Assim como no RU-T, a maior PVM observada por Costa et al. (2021) não ocorreu na mesma TCO em que se deu o melhor rendimento de CH<sub>4</sub>. O aumento da TCO de 1,2 para 7,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> por meio de elevações na concentração de substrato sob um TDH de 24 h favoreceu a PVM, não apresentando no intervalo estudado um decaimento da PVM em razão de aumentos na TCO.

A digestão anaeróbia em fase única realizada neste estudo sob condição termofílica, concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup> e TDH de 24 h apresentou produção volumétrica de metano equivalente a 134,1 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ou 3,2 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ou ainda 118,8 mol de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Ao ser utilizada TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> os resultados foram: 145,4 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ou 3,5 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ou 130 mol de CH<sub>4</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Estes resultados foram superiores aos obtidos nos trabalhos descritos previamente, os quais forneceram PVM entre 0,074 – 2,5 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (VLASSIS et al., 2013; FERRAZ JUNIOR et al., 2016; JO;

KIM; LEE, 2016; LOVATO et al., 2016; COSTA et al., 2021). Além do tipo de reator, outro fator que pode ter possibilitado a utilização de TCO superiores àquelas que comumente são aplicadas na digestão anaeróbia de águas residuárias, seria a co-digestão de soro de queijo e glicerol. Apesar do soro de queijo e glicerol apresentarem uma rápida produção de intermediários que podem acumular-se no reator e prejudicar a etapa da metanogênese, a junção desses dois substratos traz mais estabilidade ao processo e incrementos na produção de  $\text{CH}_4$ , conforme demonstrado por Lovato et al. (2016). Destaca-se também a temperatura de  $55^\circ\text{C}$  adotada no RU-T, uma vez que a adoção de temperatura na faixa termofílica aumenta as velocidades de reação e fornece maiores produções de metano (KOMILIS et al., 2017; COSTA et al., 2021), conforme evidenciado na digestão de glicerol realizada por Costa et al. (2021) que observaram em  $55^\circ\text{C}$  rendimento e PVM 22 e 122% superiores aos fornecidos em  $30^\circ\text{C}$ . No entanto, temperaturas mais amenas são mais estáveis e, assim, estudos aplicando condições mesofílicas tem prevalecido na literatura (KOMILIS et al., 2017). O lodo termofílico do processamento de vinhaça de cana-de-açúcar que foi utilizado na inoculação do RU-T também pode ter favorecido as maiores produções de biogás, uma vez que a vinhaça contém glicerol em sua composição (FUESS et al., 2017), e, portanto, este lodo poderia já estar adaptado ao glicerol como substrato.

#### **4.1.1.2. Metabólitos solúveis no RU-T**

A fim de verificar o efeito da TCO sob as rotas metabólicas, as porcentagens molares dos metabólitos solúveis identificados no RU-T são apresentadas na Figura 17. Ácido acético (HAc) (31,1-66,8%) e ácido propiônico (HPr) (10,9-61,5%) foram os principais metabólitos, sendo identificados em menor proporção ácido isovalérico (HIsVa) (0,0-10,5%), ácido valérico (HVa) (0,0-3,9%), ácido butírico (HBu) (0,0-2,5%), ácido láctico (HLa) (0,0-2,1%) e ácido capróico (HCa) (0,0-7,4%). Apenas na TCO de  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ácido isobutírico (HIsBu) apresentou elevada porcentagem (40,6 %), não sendo identificado nas TCO de 2-10  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , e exibindo porcentagem molar de 1,1% em 20  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ .



**Figura 17** – Distribuição dos metabólitos (porcentagem molar) do RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h.

A Figura 17 aponta maior diversidade de metabólitos no RU-T, com o acúmulo de ácidos de cadeia com 3C ou superiores, à medida que a TCO aumenta. Segundo Jo, Kim e Lee (2016) o acúmulo desses ácidos de cadeias maiores deve-se ao aumento da pressão parcial de hidrogênio, a qual inibe a acetogênese de ácidos de cadeia mais longa. As concentrações de cada ácido orgânico são indicadas na Tabela 16.

**Tabela 16** – Concentração dos metabólitos ácidos produzidos no RU-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>MY (mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>)</b>	143,4 ± 63,0	219,6 ± 70,0	248,5 ± 58,0	253,0 ± 46,6	203,5 ± 68,5	155,5 ± 27,5
<b>HAc (mgHAc.L<sup>-1</sup>)</b>	187,9 ± 39,6	316,0 ± 112,8	242,9 ± 71,3	218,9 ± 106,7	367,3 ± 79,6	470,8 ± 239,9
<b>HPr (mgHPr.L<sup>-1</sup>)</b>	115,1 ± 34,6	272,1 ± 122,0	201,9 ± 147,9	213,0 ± 87,2	110,4 ± 70,5	1147,3 ± 342,5
<b>HIsVa (mgHIsVa.L<sup>-1</sup>)</b>	NI	NI	81,5 ± 0,4	10,6 ± 0,1	10,0 ± 3,6	40,1 ± 16,0
<b>HIsBu (mgHIsBu.L<sup>-1</sup>)</b>	NI	NI	NI	NI	490,6 ± 146,0	25,2 ± 16,9
<b>HBu (mgHBu.L<sup>-1</sup>)</b>	NI	NI	NI	16,0 ± 8,1	NI	17,5 ± 11,0
<b>HCa (mgHCa.L<sup>-1</sup>)</b>	NI	NI	NI	63,0 ± 49,0	17,2 ± 1,0	NI
<b>HLa (mgHLa.L<sup>-1</sup>)</b>	NI	NI	NI	NI	25,6 ± 6,4	NI
<b>HVa (mgHVLa.L<sup>-1</sup>)</b>	NI	NI	NI	NI	NI	100,9 ± 25,5

NI: Não identificado; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsVa: ácido isovalérico; HIsBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HCa: ácido capróico; HLa: ácido láctico; HVa: ácido valérico

Analisando a produção de HAc na Tabela 16, observa-se que o aumento na TCO de 5 para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> promoveu queda na concentração de HAc de 316,0 mgHAc.L<sup>-1</sup> (58,9% dos metabólitos em base molar) para 218,9 mgHAc.L<sup>-1</sup> (49,6%). A partir de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, atesta-se um aumento gradual da concentração deste ácido à medida que maiores quantidades de substrato são inseridas no reator, atingindo 367,3 e 470,8 mgHAc.L<sup>-1</sup> em 15 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. Observa-se na Tabela 16 que, conforme menores concentrações de HAc foram detectadas, maiores foram os rendimentos de metano alcançados, atingindo o rendimento máximo de 253,0 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na concentração mais baixa de HAc para o intervalo de TCO de 5 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Apesar da TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (187,9 mgHAc.L<sup>-1</sup>) ter apresentado menor quantidade de HAc do que a condição com 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (218,9 mgHAc.L<sup>-1</sup>), verifica-se que a porcentagem molar em 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (66,8%) foi a maior dentre todas as TCO aplicadas, conforme exposto na Figura 17. As concentrações de HAc e HPr em 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> deve-se provavelmente a limitação de substrato, e não a uma atividade mais intensa dos microrganismos. A produção de CH<sub>4</sub> pode ocorrer por duas vias: acetoclástica, com a conversão de HAc a CH<sub>4</sub>, e hidrogenotrófica com a conversão de CO<sub>2</sub> e consumo de H<sub>2</sub> (ANGELIDAKI et al., 2018). Assim, o incremento no rendimento de 143,4 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 253,0 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> pode ser atribuído ao consumo de HAc, o qual pode ter ocorrido por conversão direta a CH<sub>4</sub> ou por conversão de HAc a H<sub>2</sub>, o qual posteriormente foi utilizado para produzir CH<sub>4</sub> (DYKSMA; JANSEN; GALLERT, 2020). Como as TCO de 7,5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> apresentaram valores similares de HAc, 242,9 e 218,9 mgHAc.L<sup>-1</sup>, os rendimentos de CH<sub>4</sub> também foram próximos, 248,5 e 253,0 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.

Com relação ao ácido propiônico (HPr), verifica-se que ao aplicar 5, 7,5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram produzidos 272,1 mgHPr.L<sup>-1</sup>, 201,9 mgHPr.L<sup>-1</sup> e 213,1 mgHPr.L<sup>-1</sup>, correspondendo a 41,1%, 36,0% e 39,1% dos metabólitos, respectivamente. De acordo com Ferraz Junior et al. (2016), a degradação de HPr é a etapa limitante da taxa de produção geral de metano em sistemas termofílicos. As concentrações de HPr determinadas entre as TCO de 2 e 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> na Tabela 16 exibiram valores abaixo da concentração inibitória para metanogênese (900 mg.L<sup>-1</sup>) (WANG et al., 2009). No entanto, o acréscimo para TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> acarretou acúmulo de HPr no reator, apresentando concentração de 1147,3 mgHPr.L<sup>-1</sup> (61,5% dos metabólitos), acima do valor limite estabelecido na literatura, comprometendo a produção de CH<sub>4</sub>, e resultando no mais baixo rendimento de 155,5 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.

Comparando os trabalhos da literatura que utilizaram soro de queijo e glicerol para produção de metano, verifica-se que HAc e HPr foram os principais metabólitos identificados (FERNÁNDEZ et al., 2015; JO; KIM; LEE, 2016; LOVATO et al., 2016; COSTA, 2017). Costa (2017) tratando glicerol bruto com TCO entre 4 e 7 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em RALF termofílico detectaram frações molares de HAc entre 33,5% e 40,6% e de HPr entre 23,5% e 30,1%. Na co-digestão de soro de queijo e glicerol estudada por Lovato et al. (2016) em reator AnSBBR mesofílico a distribuição dos metabólitos consistiu em 77,0 - 86,4% de HAc, seguido por 11,9 - 19,3% de HPr. Em menor proporção, HBU (1,7-5,0%) também foi detectado. Os autores não verificaram acentuadas variações na composição molar dos metabólitos em função do acréscimo de glicerol na mistura afluente. No entanto, nos ensaios com apenas soro de queijo e glicerol foi possível identificar que a mono-digestão de glicerol culminou em maior produção de HPr (54,0%) do que a mono-digestão de soro de queijo (26,7%) (LOVATO et al., 2016).

#### 4.1.2. Influência do tempo de detenção hidráulica no desempenho do RU-T

Na Tabela 17 são apresentados os resultados de desempenho referentes ao pH, acúmulo de AOV e razão AI/AP do RU-T na avaliação do efeito do TDH sobre a produção de metano, operando com concentração de substrato de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>. O RU-T foi operado por 40 d no TDH de 20 h e 17 d no TDH de 16 h.

**Tabela 17** – pH reacional, concentração de ácidos orgânicos voláteis e razão AI/AP no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>

TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	pH	AOV (mgHAc.L <sup>-1</sup> ) (mínimo-máximo)	AI/AP (mínimo-máximo)
24	10	8,4 ± 0,5	89 – 242	0,24 – 0,32
20	12	7,9 ± 0,2	122 - 189	0,26 – 0,56
16	15	7,7 ± 0,1	156 - 245	0,40 – 0,57

Conforme indicado na Tabela 17, o decréscimo no TDH de 24 h para 20 e 16 h resultou no decréscimo do pH de 8,4 para 7,9 e 7,7, respectivamente. Os TDH de 24 e 16 h foram os que promoveram as concentrações de AOV mais elevadas, 89 – 242 mgHAc.L<sup>-1</sup> e 189 – 245 mgHAc.L<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto o TDH de 20 h apresentou 122 – 189 mgHAc.L<sup>-1</sup>. Bicarbonato de sódio foi adicionado a alimentação para ajudar a controlar o pH do reator, sendo inserido na razão 0,4 – 0,6 gNaHCO<sub>3</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, variando de acordo com a necessidade da manutenção do pH. Conforme mencionado anteriormente, uma das vantagens da co-digestão é

o aumento da capacidade de tamponamento e estabilização do pH. No entanto, somente a co-digestão, sem adição de alcalinizante, não foi capaz de tamponar o pH no RU-T. Apesar de ter sido adicionado alcalinizante ao reator, observa-se que a quantidade inserida foi inferior a aplicada por Costa (2017) na digestão anaeróbia de glicerol em RALF termofílico, no qual foi adicionado  $1,0 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}^{-1}$ . Lovato et al. (2016) estudando a co-digestão de soro de queijo e glicerol em reator AnSBBR mesofílico aplicaram  $0,7 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}^{-1}$ . Mockaitis et al. (2006) utilizaram razão  $0,5 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}^{-1}$  para digestão de soro de queijo nas concentrações de  $500$  e  $1000 \text{ mgDQO.L}^{-1}$  e  $0,25 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}^{-1}$  para  $2000$  e  $4000 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ . Avaliando a estabilidade do processo com base na razão AI/AP, conclui-se que em todas as condições de TDH exploradas o reator se manteve estável, apresentando as seguintes razões:  $0,24-0,32$  (TDH 24h),  $0,26-0,56$  (TDH 20h) e  $0,40-0,57$  (TDH 16h). Todavia, cabe ressaltar que nos TDH de 20 e 16 h, a razão AI/AP atingiu o seu valor máximo ( $0,56$  e  $0,57$ ), o que indica que nessas TCO a quantidade de alcalinidade intermediária em relação a alcalinidade parcial foi mais elevada do que a apresentada no TDH de 24 h ( $0,24-0,32$ ). A alcalinidade intermediária (AI) é formada por ânions dos ácidos orgânicos gerados na fermentação e a alcalinidade parcial (AP) é relacionada apenas à alcalinidade bicarbonato (MARTÍN-GONZÁLEZ; FONT; VICENT, 2013). Dessa forma, as maiores razões AI/AP nos TDH de 20 e 16 h indicam menor eficiência na neutralização dos ácidos produzidos e poderia explicar os menores valores de pH nesses TDH do que no TDH de 24 h, apesar das concentrações de AOV terem sido mais baixas.

A remoção de DQO, conversão de carboidratos e glicerol para cada TDH encontram-se na Tabela 18. A remoção de DQO no RU-T oscilou entre  $87,0$  e  $87,7\%$ , indicando que a degradação de matéria orgânica no reator pode ser associada à concentração de substratos e que a faixa de TDH aplicada nesse estudo não interferiu na remoção de DQO. Elangovan e Sekar (2015) estudando o tratamento de água residuária de laticínio em reator UASB mesofílico aplicaram TDH entre 12 e 24 h e observaram que a variação no TDH de 16 a 24 h apresentou eficiência de remoção de DQO entre  $84,3-94,3\%$ . Najafpour et al. (2010) empregaram reator de leito fixo (UAPB) mesofílico na digestão anaeróbia de soro de queijo e verificaram remoções de matéria orgânica entre  $83,2$  e  $94,5\%$  ao utilizar TDH 16-24 h e  $60 \text{ gDQO.L}^{-1}$ . Comportamento semelhante ao observado na degradação de matéria orgânica foi averiguado no consumo de carboidrato e glicerol. Ao diminuir o TDH de 24 h para 16 h, observou-se no RU-T conversões de  $95,5 - 96,0\%$  para carboidrato totais e de  $98,7 - 98,8\%$  para o glicerol, indicando um eficiente e constante consumo dos substratos.



**Tabela 18** – Remoção de DQO, carboidratos totais e glicerol no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>

TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Remoção de DQO (%)	Conversão de carboidrato (%)	Conversão de glicerol (%)
24	10	87,7	95,6	98,7
20	12	87,5	95,5	98,8
16	15	87,0	96,0	98,7

#### 4.1.2.1. Rendimento e produção volumétrica de metano no RU-T

Diferente do que ocorreu com a remoção de DQO e consumo de substratos, o rendimento de metano apresentou mudanças à medida que menores TDH foram sendo empregados no reator (Tabela 19). Dessa maneira, ao diminuir o TDH de 24 h para 20 h, o rendimento aumentou aproximadamente 15,6%, correspondendo a 292,5 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub>. No TDH de 16 h, rendimento de 283,9 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub> foi observado.

**Tabela 19** – Rendimento, produção volumétrica e conteúdo de CH<sub>4</sub> no biogás do RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>

TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	MY (mL de CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> <sub>cons</sub> )	%CH <sub>4</sub> no biogás (%)	PVM (mLCH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
24	10	253,0 ± 46,6	65,8 ± 3,8	134,1 ± 35,9
20	12	292,5 ± 46,4	59,7 ± 5,9	188,2 ± 45,7
16	15	283,9 ± 33,1	65,6 ± 7,7	212,5 ± 45,1

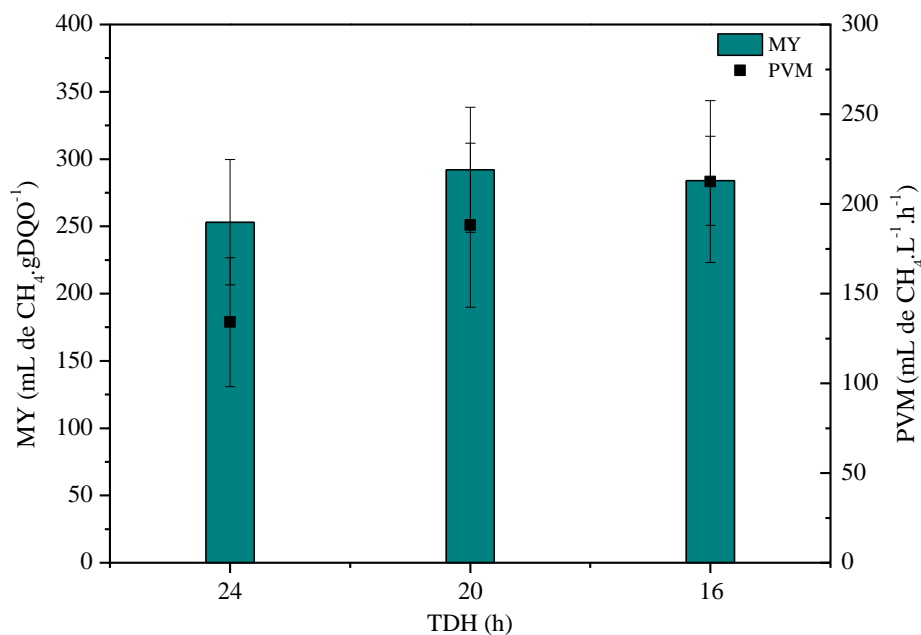
MY: rendimento de metano; PVM: produção volumétrica de metano

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que a aplicação de TDH mais baixos do que os que são usualmente vistos na literatura (> 5 d) (YANG; TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2008; VLASSIS et al., 2013; JO; KIM; LEE, 2016; TREU et al., 2019; ASUNIS et al., 2020), não foi um problema no RALF termofílico, e que o TDH de 20 h foi o que apresentou o máximo rendimento de metano. Gannoun et al. (2008) variaram o TDH de 4 para 1 d em filtro anaeróbico mesofílico tratando soro de queijo e observaram aumento no rendimento até 280 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> no TDH de 2 d, com posterior decréscimo para 110 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> ao diminuir o TDH para 1 d. Chetpattananondh et al. (2015) estudaram a co-digestão mesofílica

de esterco de porco e glicerol em CSTR e, assim como observado neste estudo e por Gannoun et al. (2008), observaram aumento no rendimento de metano de 0,33 para 0,46 L CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e de 0,30 para 0,47 L CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> ao diminuir o TDH de 10 para 2,5 d aplicando 5,3 e 2,6 gDQO.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os menores rendimentos nos TDH de 24 e 16 h podem ser justificados pelas maiores concentrações de AOV nesses TDH (89 – 242 e 156 – 245 mgHAc.L<sup>-1</sup>) do que no TDH de 20 h (122 – 189 mgHAc.L<sup>-1</sup>).

O conteúdo de metano no biogás foi semelhante nas três condições de TDH, variando entre 59,7 e 65,8%. Valores entre 50 – 75% para porcentagem de metano nos processos anaeróbios são comumente encontrados (ANUKAM et al., 2019). Fernández et al. (2015) estudaram a digestão termofílica de soro de queijo, e assim como neste estudo, observaram composição de metano constante no biogás (52.3 – 58.2%) ao variarem o TDH de 25 a 8,3 d.

Com relação à produção volumétrica de metano, acréscimo de aproximadamente 58,5% na PVM foi verificado conforme o TDH variou de 24 h para 16 h. A Figura 18 apresenta o perfil da PVM em função do TDH, juntamente com o perfil do rendimento. Assim, nos TDH de 24, 20 e 16 h, as produções volumétricas foram 134,1 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 188,2 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 212,5 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente. Tal comportamento se assemelha a outros estudos envolvendo reator RALF, nos quais reduções no tempo de detenção hidráulica resultaram em PVH mais elevadas como consequência do aumento de substratos disponíveis para conversão (RAMOS; SILVA, 2020; COSTA et al., 2021).



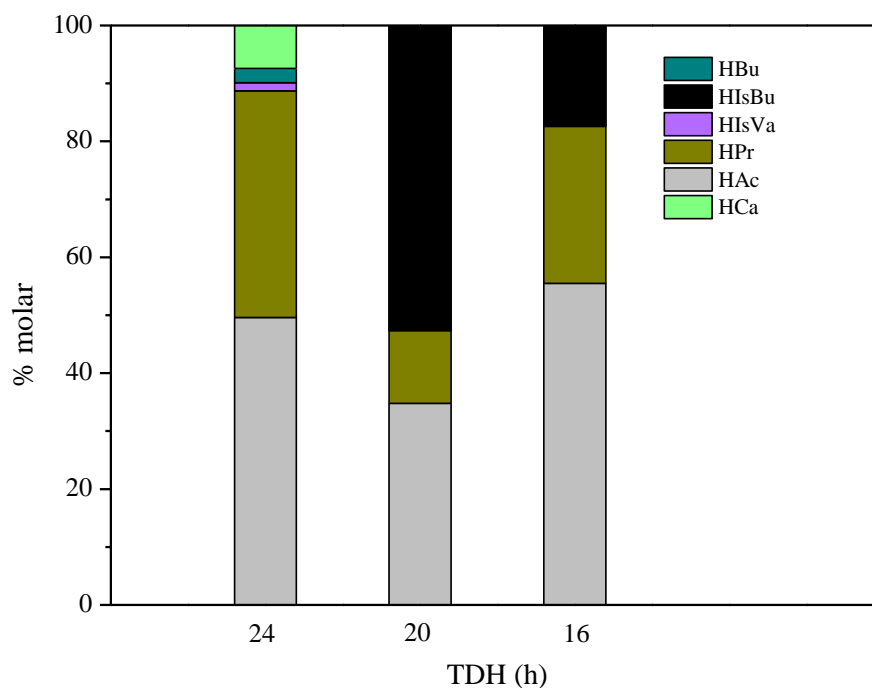
**Figura 18** – Rendimento e produção volumétrica de metano produzidos no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração afluyente de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>

O intervalo de TCO (10 a 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) utilizado na avaliação do TDH corresponde a um intervalo que também foi utilizado no estudo referente à influência da concentração afluyente. Analisando o comportamento do rendimento de metano nos diferentes estudos no mesmo intervalo, verifica-se nas condições avaliadas no RU-T que a concentração afluyente é uma variável mais decisiva para o rendimento do que o TDH, pois ao modificar a TCO de 10 para 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> por meio de aumentos na concentração, o rendimento apresentou uma queda de 19,6%, enquanto a alteração no TDH de 24 h para 16 h promoveu um incremento de 12,2%. Contudo, para PVM, a mudança no TDH resultou em um incremento de 58,5% enquanto a variação da concentração permitiu um acréscimo de 8,4%. Este resultado está de acordo com o observado por Yan et al. (1988) que verificaram que o aumento da TCO em reator UASB por meio de decréscimos no TDH foi mais eficiente para produção de metano do que acréscimos na TCO por aumentos na concentração de matéria orgânica. Bi et al. (2020) verificaram um aumento na PVM de 0,62 para 1,48 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> com o decréscimo no TDH de 25 para 5 d em reator CSTR mesofílico tratando uma mistura de esterco de gado e resíduos alimentares. Cabrera-Díaz et al. (2017) estudaram o efeito do TDH na digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em reator de leito fixo (APBR) e observaram aumento na PVM de 0,5 para 2,26 L CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> com o decréscimo no TDH de 8 para 1,2 d.

Costa (2017) utilizando reator RALF para estudo da digestão anaeróbia de glicerol bruto com concentração constante de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}$ , verificou contínuo decréscimo no rendimento e na produção volumétrica de metano à medida que reduções no TDH foram realizadas. Ao diminuir o TDH de 36 para 12 h, a PVM decaiu de 1,98 para  $1,14 \text{ L de CH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , e o rendimento teve uma queda de 0,13 para  $0,01 \text{ m}^3 \text{ de CH}_4.\text{kgDQO}^{-1}.\text{apli}$ . No RU-T, as produções volumétricas além de aumentarem com o decréscimo no TDH, variaram entre 3,2 e  $5,1 \text{ L de CH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Dessa maneira, observa-se um comportamento diferente do apresentado neste trabalho, apesar das condições de operação terem sido semelhantes: processo termofílico, reator RALF, mesmo inóculo, aplicação de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}$  e faixa de TDH coincidente. Pode-se concluir então, que o desempenho superior verificado no RU-T se atribui a co-digestão do soro de queijo com o glicerol.

#### 4.1.2.2. Metabólitos solúveis

Os principais metabólitos produzidos no RU-T ao avaliar o efeito do TDH foram: HAc (34,8-55,5%), HPr (12,5-42,3%), HIsBu (0,0-52,7%), HBu (0,0-2,7%), HIsVa (0,0-1,5%) e HCa (0,0-7,4%), conforme apresentado na Figura 19. A concentração de cada metabólito detectado no RU-T no estudo do efeito do TDH é exibida na Tabela 20.



**Figura 19** – Distribuição de metabólitos (porcentagem molar) no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração afluente de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}$

A concentração de HAc para os TDH 24, 20 e 16 h foram: 218,9 mgHAc.L<sup>-1</sup>, 76,9 mgHAc.L<sup>-1</sup> e 106,9 mgHAc.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim, observa-se que a conversão de HAc foi mais eficiente no TDH de 20 h, uma vez que este TDH apresentou a mais baixa concentração de HAc acompanhada pelo mais elevado rendimento de metano da operação (292,5 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>). Avaliando os demais metabólitos, verifica-se que a concentração de HPr exibiu comportamento similar ao do HAc, sendo o TDH de 24 h responsável pela maior concentração de HPr, 213,0 mgHPr.L<sup>-1</sup>, seguido do TDH de 16 h com 64,5 mgHPr.L<sup>-1</sup>, e do TDH de 20 h com a menor produção de HPr igual a 34,2 mgHPr.L<sup>-1</sup>. No processo de digestão anaeróbia, elevadas concentrações de HPr podem inibir o desempenho das *archaeas* metanogênicas, sendo 900 mg.L<sup>-1</sup> o limite tolerável por esses microrganismos (WANG et al., 2009). Sendo assim, as concentrações encontradas no RU-T ao aplicar TDH entre 16-24 h encontram-se abaixo do valor inibitório. HIsBu apresentou sua maior concentração de 170,9 mgHIsBu.L<sup>-1</sup> no TDH de 20 h, correspondendo a 52,7% dos metabólitos nesta condição. No TDH de 16 h a concentração de HIsBu decaiu para 49,3 mgHIsBu.L<sup>-1</sup>, não sendo detectado HIsBu no TDH de 24 h.

**Tabela 20** – Concentração dos metabólitos ácidos produzidos no RU-T nos TDH de 16, 20 e 24 h e concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>

TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	10	12	15
TDH (h)	24	20	16
MY (mL CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> )	253,0 ± 46,6	292,5 ± 46,4	283,9 ± 33,1
HAc (mgHAc.L <sup>-1</sup> )	218,9 ± 106,7	76,9 ± 67,1	106,9 ± 47,0
HPr (mgHPr.L <sup>-1</sup> )	213,0 ± 87,2	34,2 ± 18,1	64,5 ± 43,6
HIsVa (mgHIsVa.L <sup>-1</sup> )	10,6 ± 0,1	NI	NI
HIsBu (mgHIsBu.L <sup>-1</sup> )	NI	170,9 ± 9,7	49,3 ± 2,1
HBu (mgHBu.L <sup>-1</sup> )	16,0 ± 8,1	NI	NI
HCa (mgHCa.L <sup>-1</sup> )	63,0 ± 49,0	NI	NI

NI: Não identificado; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsVa: ácido isovalérico; HIsBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HCa: ácido caprótico

#### 4.1.3. Balanço de DQO no RU-T

Com o objetivo de averiguar a parcela de DQO destinada a cada composto do RU-T em suas respectivas TCO, foi realizado balanço de DQO para todas as condições estudadas. As

DQO equivalentes dos componentes do efluente e a parcela de DQO que não foi identificada estão apresentadas na Tabela 21. A  $DQO_{Ex}$  foi definida como a DQO medida no efluente, já a  $DQO_{Eq}$  a soma das DQO equivalentes de cada composto do efluente (metabólitos, SSV, carboidrato e glicerol não consumidos). À respeito dos sólidos suspensos voláteis (SSV), as quantidades medidas no RU-T variaram de  $83,00 \pm 24,25 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $309,75 \pm 76,51 \text{ mg.L}^{-1}$  com aumento da TCO de 2 para 20  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  no estudo da concentração afluyente, e de  $252,4 \pm 77,0 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $317,3 \pm 41,2 \text{ mg.L}^{-1}$  com decréscimo no TDH de 24 para 16 h.

Como pode ser observado na Tabela 21, as concentrações 7,5, 10 e 15  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  exibiram diferença percentual entre a  $DQO_{Ex}$  e a  $DQO_{Eq}$  menor ou igual a 10%, enquanto as concentrações de 2 e 20, e o TDH de 20 e 16 h apresentaram diferenças superiores a 20%, com o TDH de 16 h sendo a condição que forneceu maior discrepância entre o valor medido e o calculado com base nos componentes identificados no efluente. No entanto, deve-se considerar que foi utilizado para calcular a  $DQO_{Eq}$  várias médias que possuem desvios (diferentes metabólitos, SSV, carboidrato e glicerol afluentes) e que a  $DQO_{Ex}$  foi determinada através da média de apenas um parâmetro, que é a própria DQO de saída do reator. Além disso, a diferença pode ser devido à presença de outros metabólitos que não foram detectados.

**Tabela 21** – Balanço de DQO realizado no RU-T

<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>15</b>
<b>Concentração (gDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	2	5	7,5	10	15	20	10	10
<b>TDH (h)</b>	24	24	24	24	24	24	20	16
<b>SSV (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	111,5	97,0	140,4	338,9	495,2	416,0	426,2	324,6
<b>Carboidrato efluente (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	28,0	45,6	69,2	173,7	346,9	253,0	172,0	153,2
<b>Glicerol efluente (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	53,2	54,9	57,3	78,8	87,4	86,3	66,4	67,6
<b>HAc (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	201,1	338,1	259,9	234,2	393,1	503,7	82,3	114,4
<b>HPr (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	173,8	343,5	304,8	321,7	166,7	1732,4	51,6	97,4
<b>HIsVa (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	166,3	21,6	20,4	81,8	-	-
<b>HVa (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	-	205,9	-	-
<b>HIsBu (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	892,9	45,8	311,1	89,7
<b>HBu (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	29,1	-	31,8	-	-
<b>HLa (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	27,4	-	-	-
<b>HCa (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	138,6	37,9	-	-	-
<b>DQO<sub>Ex</sub></b>	916,4	1076,9	1113,7	1397,5	2543,4	4745,0	1405,3	1492,1
<b>DQO<sub>Eq</sub></b>	567,5	879,0	997,9	1336,7	2467,8	3356,8	1109,6	846,9
<b>DQO<sub>Ex</sub> – DQO<sub>Eq</sub> (%)</b>	38	18	10	4	3	29	21	43

SSV: sólidos suspensos voláteis; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; HIsBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HLa: ácido láctico; HCa: ácido capríco

Na Tabela 22 são apresentadas as DQO equivalentes (DQOeq) dos rendimentos de CH<sub>4</sub> verificados em cada TCO. Também estão indicadas as porcentagens de DQO do afluente do reator que foram direcionadas para o rendimento de CH<sub>4</sub> (%DQO<sub>CH4</sub>). Assim, conclui-se que, no estudo da concentração de substratos, a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi a que teve maior parcela de DQO convertida a CH<sub>4</sub> (63,4%), enquanto as TCO de 2 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> apresentaram aproveitamento da DQO para produção de metano inferior a 40%. Ao avaliar o efeito do TDH, a TCO que apresentou maior conversão de DQO afluente à CH<sub>4</sub> foi a TCO de 12 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, correspondente ao TDH 20 h, com aproveitamento de 73,1%.

**Tabela 22** – Parcela de DQO afluente convertida a CH<sub>4</sub> no RU-T

TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	2	5	7,5	10	15	20	12	15
Concentração (DQO.L <sup>-1</sup> )	2	5	7,5	10	15	20	10	10
TDH (h)	24	24	24	24	24	24	20	16
DQOeq (mgDQO.L <sup>-1</sup> )	641	2638	4627	7210	8243	8031	8219	8063
%DQO <sub>CH4</sub>	25,8	49,9	60,6	63,4	49,3	35,2	73,1	70,5

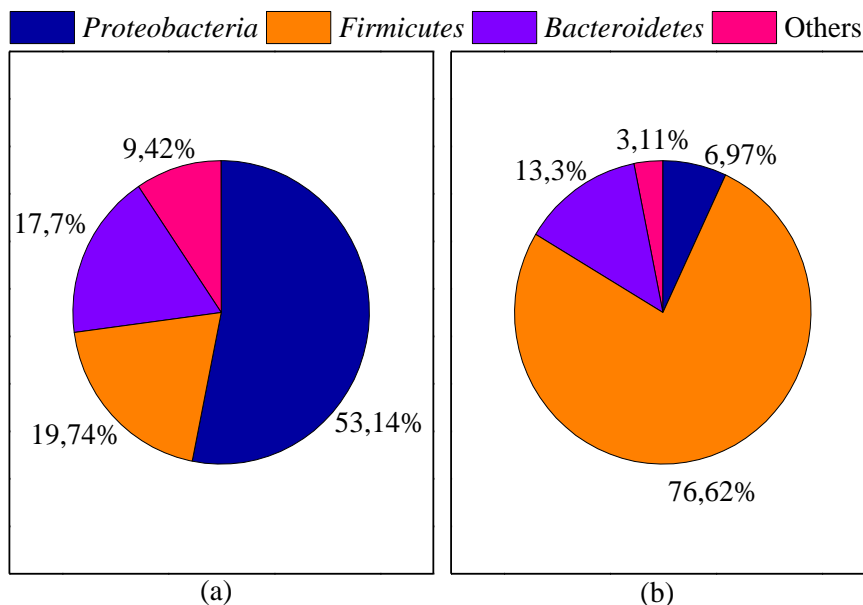
#### 4.1.4. Análise da comunidade microbiana do RU-T

O sequenciamento a fim de determinar os microrganismos envolvidos na co-digestão termofílica de soro de queijo e glicerol foi realizado somente nas amostras das TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> do estudo do aumento da concentração afluente (TDH fixo de 24 h), avaliando como o aumento da concentração afetou a comunidade microbiana até a condição de maximização do rendimento de metano. A análise microbiológica aponta que as amostras foram compostas por 98,87% de bactéria e 1,13% de *archaeas* na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e por 99,86% de bactéria e 0,14% de *archaeas* na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h, estando de acordo com trabalhos da literatura que apresentaram domínio *archaea* com parcela inferior a 2% da amostra microbiana (LIU et al., 2016; FONTANA et al., 2018a). De acordo com Nazina et al. (2018), primers universais possuem maior seletividade para os microrganismos bacterianos, e, portanto, as bactérias são mais identificadas nas amostras. Ainda segundo os autores, tais primers são insuficientemente específicos para amplificação dos



genes 16S rRNA das *archaeas*. Entretanto, todas as amostras analisadas do RU-T apresentaram boa cobertura, acima de 99%. Com relação ao domínio bactéria, os índices de Shannon e Simpson na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi 4,507 e 0,89, e na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi 3,978 e 0,84, indicando menor diversidade microbiana com o aumento da TCO. A seleção dos microrganismos com o aumento da TCO também pode ser confirmada por meio do decréscimo no OTUS de 654 em 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 517 em 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

A respeito da classificação das bactérias nas amostras de 5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, verificou-se que a TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi composta em sua maioria por bactérias do filo *Proteobacteria* (53,1%), seguido dos filis *Firmicutes* (19,7%) e *Bacteroidetes* (17,7%) (Figura 20a). Ao aumentar a TCO para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, ocorreu uma seleção das bactérias, conforme indicado nos índices de diversidade, e então, o filo *Firmicutes* (76,6%) passou a ser dominante com o decaimento na porção de populações pertencentes aos filis *Proteobacteria* (7,0%) e *Bacteroidetes* (13,3%) (Figura 20b). Na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o MY foi 253,0 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> enquanto em 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi observado menor MY, igual a 219,6 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. O MY mais elevado em 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> pode estar relacionado a maior abundância relativa do filo *Firmicutes*, o qual é reconhecido pela sua atuação sintrófica com microrganismos metanogênicos (WALTER et al., 2019), e pelas altas produções de H<sub>2</sub> (OTTAVIANO et al., 2017). Dessa forma, o domínio desse filo pode indicar que a produção de CH<sub>4</sub> no RU-T pode ter ocorrido predominante pelo consumo de H<sub>2</sub> por *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas. As *Firmicutes* são bactérias comumente encontradas em maior abundância em reatores anaeróbios (FONTANA et al., 2018a; TREU et al., 2019), sendo *Proteobacterias* e *Bacteroidetes* também usualmente identificadas em plantas de biogás (CAMPANARO et al., 2018). Bactérias do filo *Proteobacteria* são geralmente relacionadas ao consumo de acetato, propionato e butirato, enquanto as *Bacteroidetes* são associadas a conversão de carboidratos a AOV (WALTER et al., 2019). Portanto, o predomínio de microrganismos consumidores de intermediários precursores a produção de CH<sub>4</sub> em 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> poderia justificar o MY mais baixo nesta TCO.



**Figura 20** – Distribuição dos filos bacterianos identificados no RU-T no TDH de 24 h e TCO de (a) 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e (b) 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>

De fato, ao analisar os gêneros encontrados nas duas amostras, verifica-se maior abundância relativa de gêneros produtores de H<sub>2</sub> em 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> do que em 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Bactérias da família *Defluviitaleaceae* (gênero não identificado), conhecidas pela produção de acetato e H<sub>2</sub> a partir da fermentação termofílica de glicose (JABARI et al., 2012; MA et al., 2017), apresentaram crescimento da abundância relativa de 1,89% para 47,5% com incremento na TCO de 5 para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. As famílias *Ruminococcaceae* e *Lentimicrobiaceae* também apresentaram aumento em suas abundâncias relativas com a mudança de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, passando de 0,62% para 21,11% e 1,20% para 9,01%, respectivamente. Esses microrganismos também são descritos na literatura como produtores de H<sub>2</sub> (TIAN et al., 2014; SUN et al., 2016). No entanto, na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o gênero *Enterobacter*, o qual também é reportado na literatura por suas elevadas produções de H<sub>2</sub> (ALVAREZ-GUZMÁN et al., 2020) foi determinado com abundância relativa de 11,38%, e ao aumentar a entrada de substratos para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> observa-se que esses microrganismos foram reprimidos, apresentando abundância relativa de 0,60%. Na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ainda foram identificadas bactérias do gênero *Tolomonas* (23,8% de abundância relativa), as quais são capazes de produzir acetato, etanol e formato a partir da fermentação de glicose (FISCHER-ROMERO; TINDALL; JÜTTNER, 1996; CALDWELL et al., 2011), metabólitos que posteriormente podem ser convertidos a CH<sub>4</sub>. Ainda assim, constata-se na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, cujo máximo MY foi observado, maior abundância relativa de

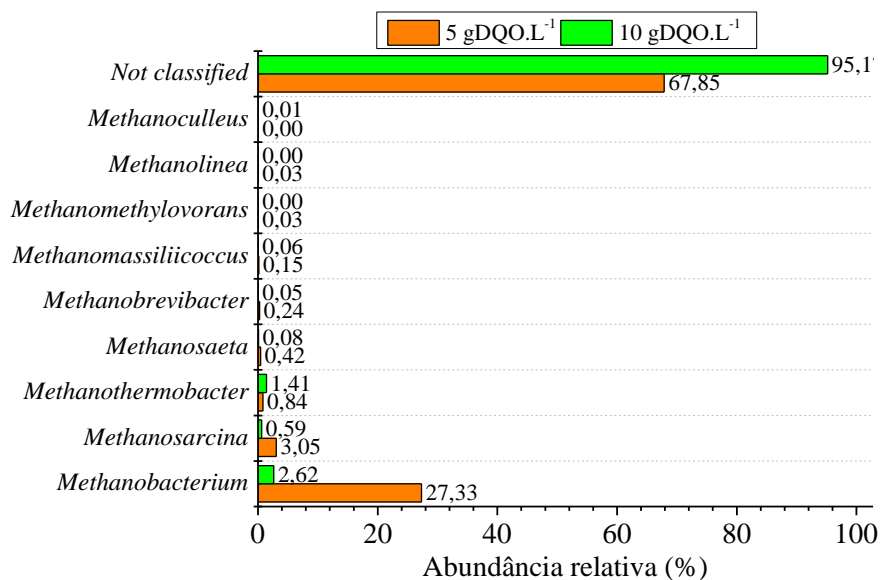
microrganismos produtores de  $H_2$ , estando de acordo com a hipótese de que a produção de  $CH_4$  em  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  tenha sido realizada predominantemente pelo consumo de  $H_2$ .

Conforme discutido previamente, as concentrações de HAc e HPr determinadas em  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ( $316,0 \text{ mgHAc.L}^{-1}$  e  $272,1 \text{ mgHPr.L}^{-1}$ ) foram superiores as observadas em  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ( $218,9 \text{ mgHAc.L}^{-1}$  e  $213,0 \text{ mgHPr.L}^{-1}$ ). Os maiores acúmulos de HAc e HPr podem ter sido causados pela presença de bactérias do gênero *Propionispira*, reportadas na literatura como produtoras de HAc e HPr (UEKI et al., 2014). A abundância relativa de *Propionispira* em  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  foi 13,5%, enquanto em  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  foi de 0,43%. Estes microrganismos além de serem produtores de AOV, também são descritos como consumidores de  $H_2$  (CABROL et al., 2017), o que poderia justificar as maiores concentrações de HAc e menor MY em  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , pois o consumo de  $H_2$  além de afetar sua conversão a metano pelos microrganismos hidrogenotróficos, também poderia diminuir a pressão parcial de  $H_2$  e favorecer a produção de intermediários. Bactéria não cultivada do filo *Bacteroidetes* (*vadinBC27* wastewater-sludge group) também foi encontrada em grande proporção na TCO de  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (13,3%), não se adaptando à adição de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (0,08%) ao reator. Essas bactérias foram identificadas em digestor anaeróbio de vinhaça (LIU et al., 2016), e sua presença no RU-T poderia estar associada ao tipo de lodo adotado neste estudo, o qual é derivado de lodo anaeróbio do tratamento de vinhaça de açúcar.

Com relação ao domínio *archaea*, na amostra correspondente a TCO de  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  foram observadas 533 espécies, enquanto em  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , 509 espécies foram determinadas. Os números de Shannon e Simpson foram 4,730 e 0,906 em  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , e 4,143 e 0,852 em  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , reafirmando a maior diversidade na comunidade microbiana na menor TCO. Assim como ocorreu no domínio bactéria, o aumento da TCO de  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  promoveu uma seleção microbiana que foi benéfica para produção de  $CH_4$ , aumentando o MY de 219,6 para  $253,0 \text{ mL CH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{cons}$ .

Na TCO de  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , cerca de 67,71% dos microrganismos classificados como pertencentes ao domínio *archaea* não foram classificados a nível de filo, classe e gênero. Na TCO de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , essa parcela de microrganismos do domínio *archaea* que não foram identificados foi maior, cerca de 95,14%. Com relação aos microrganismos classificados, observa-se maior proporção do filo *Euryarchaeota*, cujo as abundâncias relativas em  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  foi de 32,15% e 4,83%, respectivamente. Assim como ocorreu com as bactérias, o aumento na TCO de  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  mudou a dinâmica microbiana do reator (Figura 21). Dessa forma, foram identificados em  $5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  os gêneros *Methanobacterium* (27,33%), *Methanosarcina* (3,05%) e

*Methanothermobacter* (0,84%), e em 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> *Methanobacterium* (2,62%) *Methanothermobacter* (1,41%) e *Methanosarcina* (0,59%). Com a adição de maiores quantidades de substrato, o gênero *Methanobacterium* continuou predominando sobre os demais microrganismos, no entanto, verifica-se que *Methanothermobacter* conseguiu se adaptar melhor a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> do que *Methanosarcina*. Como *Methanobacterium* e *Methanothermobacter* são *archaeas* metanogênicas hidrogênotróficas (ANGELIDAKI et al., 2018), o aumento da proporção de *Methanothermobacter* fortalece a hipótese de que a principal via de produção de CH<sub>4</sub> tenha sido por meio de consumo de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, e que o máximo MY se deu por atividades sintróficas entre os microrganismos hidrogenotróficos e as *Firmicutes*. A escassez de metanogênicos acetoclásticos também corrobora a idéia de que o acetato tenha sido consumido principalmente por bactérias oxidantes de acetato sintrófico (SAOB) (DYKSMA; JANSEN; GALLERT, 2020), ou seja, que as menores concentrações de HAc em 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> possam ser decorrentes da conversão de HAc para H<sub>2</sub>, e posterior consumo de H<sub>2</sub> para produção de CH<sub>4</sub>. *Methanosarcina* são microrganismos capazes de produzir CH<sub>4</sub> utilizando tanto H<sub>2</sub> como acetato (ENZMANN et al., 2018). No entanto, observa-se uma queda em sua abundância relativa à medida que maiores concentrações de substrato foram adicionadas ao reator. Tal fato pode ter ocorrido pois o crescimento de metanogênicos acetoclásticos dependem da concentração de acetato, além disso, em baixas concentrações de acetato sob condição termofílica, os SAOB são dominantes sobre os metanogênicos acetoclásticos (HATTORI, 2008; DYKSMA; JANSEN; GALLERT, 2020). Dessa forma, é possível explicar o fato de metanogênicos consumidores de H<sub>2</sub> terem se sobressaído aos acetoclásticos, que não conseguiram atingir elevado crescimento devido às condições termofílicas e às baixas concentrações de acetato (provavelmente consumido por SAOB). De maneira geral, as *archaeas* metanogênicas encontradas no RU-T estão de acordo com os resultados da literatura, nos quais os gêneros *Methanobacterium*, *Methanothermobacter* e *Methanosarcina* são usualmente reportados (WAINAINA et al., 2019; PASALARI et al., 2021).



**Figura 21** – Abundância relativa dos gêneros de *archaeas* metanogênicas no RU-T nas TCO de 5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

#### 4.2. Processo em dois estágios – Reator Acidogênico Termofílico (RA-T)

O reator acidogênico foi operado durante 477 dias, sendo 275 dias na concentração afluente de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>, 95 dias em 15 gDQO.L<sup>-1</sup> e 107 dias na concentração de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>. Em todas as concentrações estudadas o TDH foi mantido fixo em 4 h. Dessa forma, as TCO aplicadas no RA-T foram: 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Ao longo deste período, parâmetros de controle, como pH e vazão, foram monitorados diariamente.

De acordo com a literatura, a faixa ideal de pH para produção de hidrogênio está entre 4,5 – 6,5 (MOTA et al., 2018). No entanto, acima de pH 4,5 o reator RA-T não produziu hidrogênio. Por este motivo, o pH afluente foi ajustado com solução de NaOH 6 M para que o pH do meio reacional se mantivesse entre 4,0 e 4,5. Assim, o pH efluente do RA-T foi 4,1 ± 0,1 para a TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, e 4,0 ± 0,1 para as TCO de 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Todavia, o pH observado no RA-T se aproxima dos valores de pH observados na fermentação de soro de queijo utilizando TCO de 12 a 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (pH 4,3) em RALF termofílico (OTTAVIANO et al., 2017) e TCO de 12 a 68 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em RALF mesofílico (pH 4,0-4,1) (MARQUES et al., 2019).

Nas análises de composição do biogás gerado não foi detectado produção de metano, o que indica que o pré-tratamento térmico realizado no lodo termofílico utilizado para inocular o reator foi bem-sucedido. Além disso, outro fator que colabora para inibição das *archaeas*

metanogênicas é o fato do pH no reator ser um pH ácido, entre 4,0 e 4,1, o qual é inapropriado para a atividade desses microrganismos.

A DQO afluente, e as concentrações de carboidratos totais e glicerol, assim como seus respectivos consumos são retratados na Tabela 23.

**Tabela 23** - Conversão de DQO, carboidrato e glicerol no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 4 h

TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	DQO Afluente (mgDQO.L <sup>-1</sup> )	Remoção (%)	Carboidrato Afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Consumo (%)	Glicerol Afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Consumo (%)
60	11.198,3 ±	5,1	3.644,1 ±	46,6	4.249,9 ±	9,9
	1.115,6		637,8		550,3	
90	15.974,0 ±	4,7	5.436,4 ±	51,2	6.714,3 ±	9,1
	2.065,7		768,5		776,3	
120	22.470,8 ±	8,6	7.244,2 ±	41,0	9.783,6 ±	7,9
	1.820,7		630,6		1.002,2	

Analisando a Tabela 23, verifica-se que a remoção de matéria orgânica no RA-T permaneceu na faixa 4,7 – 8,6%. Este resultado para consumo de DQO está de acordo com o esperado, pois em reatores acidogênicos os substratos são convertidos em ácidos orgânicos, álcoois, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Portanto, a DQO desses produtos permanece no meio. Além disso, também se encontra presente DQO advinda de substratos (lactose e glicerol) que não foram totalmente consumidos pelos microrganismos, como será detalhado mais adiante.

Observa-se que o acréscimo da concentração de 10 gDQO.L<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup> favoreceu o consumo de matéria orgânica, aumentando a remoção de DQO de 5,1% para 8,6%. Este mesmo comportamento foi descrito por Perna et al. (2013) ao avaliarem a produção de H<sub>2</sub> em reator de leito fixo a 30°C, obtendo um aumento de 14% para 32% no consumo de DQO ao elevar a concentração de 22 gDQO.L<sup>-1</sup> para 33 gDQO.L<sup>-1</sup>. Amorim, Sader e Silva (2012) estudando a fermentação de glicose em reator RALF verificaram um aumento de 10,4% para 19% na remoção de DQO ao variar a concentração de 4 para 25 gDQO.L<sup>-1</sup> com TDH fixo em 4 h.

Utilizando co-digestão de soro de queijo e glicerol em reator AnSBBR mesofílico, Lovato et al. (2017) atingiram remoções de DQO superiores às apresentadas neste trabalho, sendo essas remoções entre 19 e 25%, utilizando taxas de carregamento orgânico entre 17,9 e 36,4 kgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>.

Além da concentração de substratos, outro parâmetro que afeta a remoção de matéria orgânica é o TDH aplicado. Ramos e Silva (2017a) avaliando a produção de  $H_2$  a partir de soro de queijo em reator RALF, observaram uma queda contínua da remoção de DQO de 16,6% para 0,5% ao diminuir o TDH de 8 h para 0,5 h. Comportamento similar foi verificado por Costa (2017), com remoção de DQO de 7,5% no TDH de 8 h e de 0,8% no TDH de 0,5 h. Ressalta-se que no TDH de 4 h e concentração de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}$ , Costa (2017) observou remoção de DQO igual a 7,5%, enquanto este trabalho alcançou remoção média de 5,1%, fornecendo portanto, resultado coerente aplicando o mesmo reator e condições operacionais semelhantes. Zahedi et al. (2018) observaram remoções de cerca de 65% ao aplicar um TDH de 20 d e consumos entre 4-10% no TDH de 5 d estudando a co-digestão de lodo de esgoto e glicerina em reator CSTR mesofílico. Dessa forma, identifica-se um comportamento recorrente nos trabalhos da literatura, nos quais os menores TDH forneceram as menores remoções de DQO.

O conteúdo de carboidratos provenientes do soro de queijo utilizado na co-digestão com o glicerol foi analisado no afluente e no efluente do reator, a fim de verificar a conversão desses compostos em produtos e subprodutos da acidogênese. Observa-se na Tabela 23 que com o aumento da TCO de  $60 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para  $90 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ocorreu uma elevação na conversão de carboidratos de 46,6% para 51,2%. Porém, ao atingir TCO de  $120 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , o RA-T exibiu um declínio no consumo de lactose, apresentando conversão de 41,0%. Em concordância com o que ocorreu no RA-T, Ottaviano et al. (2017) observaram incrementos de 71% para 83% nas conversões de carboidrato ao fixar a concentração de lactose em  $4900 \text{ mg.L}^{-1}$  e aumentar a TCO de  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para  $120 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . No entanto, na TCO de  $240 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  o consumo de lactose foi limitado, diminuindo a conversão para 52%. Com o TDH fixo em 6 h e variando a TCO entre  $12 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $60 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , conversões acima de 80% foram possíveis até a TCO de  $28 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , fornecendo consumo de 1,4% na TCO de  $60 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Assim, além de identificar comportamento análogo ao desenvolvido no RA-T, nota-se nos resultados fornecidos por Ottaviano et al. (2017) que o consumo de lactose em reator RALF é mais sensível a alterações na concentração do que no TDH.

Utilizando reator EGSB e TCO de  $60 \text{ gDQO.L}^{-1}$ , Ramos (2016) verificou conversão semelhante à apresentada neste trabalho estudando a fermentação de soro de queijo, obtendo consumo de 45,6% de carboidrato. No entanto, o autor utilizou concentração de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  e TDH de 6 h. Ramos e Silva (2017a) também estudaram o efeito do TDH na conversão de carboidratos em reator RALF na concentração de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose, e observaram que o

decréscimo no TDH de 8 h para 0,5 h, promoveu uma queda no consumo de lactose de 66,1% para 23,2%.

Utilizando co-digestão do soro de queijo com glicerol para produção de  $H_2$ , Lovato et al. (2017) atingiram conversões de carboidrato entre 88% e 98%. Verifica-se que as conversões atingidas por Lovato et al. (2017) foram maiores do que o consumo de 51,2% obtido neste trabalho. Entretanto, as concentrações afluentes empregadas pelos autores variaram entre 4.700 e 9.300 mgDQO.L<sup>-1</sup> e o reator utilizado foi do tipo batelada sequencial em condição mesofílica, enquanto este trabalho utilizou reator RALF termofílico com concentrações entre 10.000 mgDQO.L<sup>-1</sup> e 20.000 mgDQO.L<sup>-1</sup>, sendo o soro de queijo responsável por 50% da DQO afluente.

Analisando os consumos de carboidrato apresentados pela literatura citada anteriormente verifica-se que a TCO imposta no reator interfere diretamente na conversão desses carboidratos. Observa-se ainda que para os reatores contínuos, nas concentrações próximas ou superiores a 10 g.L<sup>-1</sup>, conversões entre 1,4 – 66,1% foram observadas (OTTAVIANO et al., 2017; RAMOS, 2016), estando, portanto, os resultados de consumo de carboidratos obtidos no RA-T de acordo com o verificado na literatura. No entanto, cabe ressaltar que as TCO aplicadas no reator (60-120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) podem ter sido muito elevadas para a atividade metabólica dos microrganismos, e o TDH de 4 h pode não ter sido suficiente para que as bactérias acidogênicas atuassem adequadamente, não permitindo que consumos superiores a 51,2% fossem atingidos. Conforme apontado no estudo de Ramos e Silva (2017a), ao aplicar elevada concentração de substratos, os melhores resultados para conversão de carboidratos ocorrem em TDH mais elevados. Os autores relataram conversão máxima de 66,1% no TDH de 8 h ao utilizar 10g.L<sup>-1</sup> de lactose. No entanto, segundo Rosa et al. (2014b), Ramos e Silva (2017a) e Ottaviano et al. (2017) o TDH ótimo para maximização do rendimento de  $H_2$  é 4 h. Portanto, apesar de ser uma alternativa para elevação dos consumos de carboidrato, o aumento do TDH poderia acarretar desvio das rotas favoráveis à produção de  $H_2$ , e fornecer menores rendimentos.

Em relação ao glicerol, a concentração afluente no RA-T variou de 4.249,9 mg.L<sup>-1</sup> à 9.783,6 mg.L<sup>-1</sup>, com consumos entre 7,9 e 9,9%, indicados na Tabela 23.

Estudando a co-digestão de resíduo de búfalo, soro de queijo e glicerol em reatores batelada, Marone et al. (2015) observaram desempenho semelhante ao apresentando no RA-T, nos ensaios contendo a co-digestão de soro de queijo e glicerol, no qual consumos de 3 e 5% foram obtidos. Na fermentação do glicerol puro, consumo de 22% foi observado. Ao realizarem a co-digestão de resíduo de búfalo e glicerol, conversões acima de 98% foram obtidas.



Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) verificaram queda no consumo de glicerol de 96,6% para 72,8% ao variar a concentração de glicerol de 9,2 para 18,1 g.L<sup>-1</sup> em reator de coluna de fluxo ascendente mesofílico (35°C) aplicando TDH de 36 h.

Costa (2017) observou mudança de 21,9% para 27,4% no consumo de glicerol em razão do acréscimo na TCO de 30 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Entretanto, ao aumentar a TCO para 480 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, verificou-se conversão de glicerol igual a 14,1%. O autor associou o baixo desempenho na conversão do glicerol a temperatura na faixa termofílica e ao acúmulo de metabólitos dissolvidos, embasando sua hipótese nos trabalhos de Ferreira (2014) e Bosio (2014) que estudaram a produção de H<sub>2</sub> a partir de glicerol em reator RALF. Ferreira (2014) utilizou RALF termofílico, enquanto Bosio (2014) adotou RALF mesofílico. Assim, o consumo no reator termofílico (55,4 – 15,8%) foi consideravelmente inferior ao consumo na condição mesofílica (91,0 – 37,0%).

Dessa forma, verifica-se que as conversões de glicerol de 7,9% a 9,9% apresentadas neste trabalho foram inferiores às encontradas na literatura. Tal fato pode ter ocorrido devido a temperatura aplicada e/ou por se tratar de uma co-digestão com soro de queijo, conforme exposto no trabalho de Marone et al. (2015). Como a lactose é mais facilmente biodegradada (LOVATO et al., 2017), pode-se supor que na co-digestão de soro e glicerol os microrganismos acidogênicos presentes no inóculo degradaram primeiramente a lactose para realização de seu metabolismo. Além disso, assim como ocorreu com a conversão de lactose, o TDH de 4 h adotado pode ter sido baixo, impedindo que ocorresse um consumo adequado do glicerol ao utilizá-lo junto a outro substrato neste curto intervalo. Outro fator que pode ter colaborado para as baixas conversões de glicerol é o pH do meio (4,0-4,1), uma vez que a conversão de glicerol é favorecida em valores de pH mais altos, conforme discutido por Mangayil, Karp e Santala (2012).

#### **4.2.1. Rendimento e produção volumétrica de hidrogênio no RA-T**

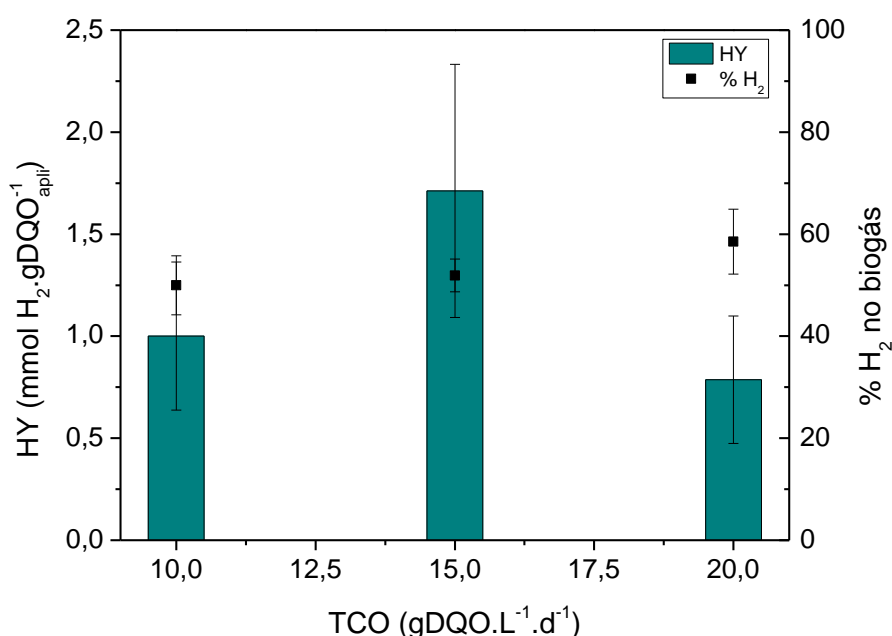
O aumento na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> promoveu incremento no rendimento de hidrogênio de 1,001 ± 0,363 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> para 1,712 ± 0,620 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>, conforme indicado na Tabela 24 e Figura 22. Com acréscimo na TCO para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o rendimento decaiu para 0,8 ± 0,3 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>. Ao analisar a composição do biogás descrita na Tabela 24, observa-se um crescimento contínuo da porcentagem de H<sub>2</sub> em decorrência do aumento na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, exibindo o ponto máximo de 58,5% de H<sub>2</sub> na TCO de 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. A produção volumétrica de H<sub>2</sub> (PVH) variou de 70,5 ± 24,3 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> a 161,2 ±

39,1 mL de  $\text{H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ou 62,8 mol de  $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  a 143,7 mol de  $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , sendo todas as PVH apresentadas na Tabela 24 de acordo com suas respectivas TCO.

**Tabela 24** – Composição do biogás, rendimento e produção volumétrica de hidrogênio no RA-T nas TCO de 60 a 120  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e TDH de 4 h

TCO ( $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	% $\text{H}_2$ no biogás	HY ( $\text{mmol de H}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{apli}}$ )	PVH ( $\text{mL de H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
60	50,0 ± 5,8	1,0 ± 0,4	70,5 ± 24,3
90	51,9 ± 3,2	1,7 ± 0,6	161,2 ± 39,1
120	58,5 ± 6,4	0,8 ± 0,3	106,7 ± 42,8

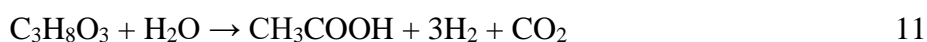
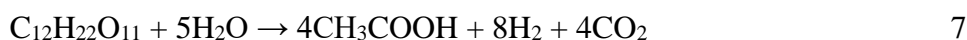
HY: rendimento de hidrogênio; PVH: produção volumétrica de hidrogênio



**Figura 22** – Conteúdo de  $\text{H}_2$  no biogás e rendimento de hidrogênio no RA-T nas TCO de 60 a 120  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e TDH de 4 h

A TCO de 90  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  foi a que proporcionou o melhor resultado tanto para o rendimento de  $\text{H}_2$  quanto para a PVH, sendo estes 1,7  $\text{mmol de H}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{apli}}$  e 161,2  $\text{mL de H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente. O máximo rendimento possível nas condições aplicadas (50% de DQO de soro de queijo, 50% de DQO de glicerol), equivale a 0,024 mol de  $\text{H}_2 \cdot \text{gDQO}_{\text{apli}}$ . Tal rendimento teórico foi calculado considerando que o soro de queijo era formado por 100% de lactose e o glicerol utilizado em sua forma pura. Além do mais, assumiu-se as rotas metabólicas que fornecem a maior produção de  $\text{H}_2$

(8 mols de  $\text{H}_2$ .mol de lactose<sup>-1</sup> e 3 mols de  $\text{H}_2$ .mol de glicerol<sup>-1</sup>), apresentadas nas Equações 7 e 11.



O rendimento de 1,7 mmol de  $\text{H}_2$ .gDQO<sup>-1</sup> verificado no RA-T, equivale a aproximadamente 7,1% do valor teórico. Apesar do rendimento estar distante do teórico, este resultado assemelha-se aos exibidos por trabalhos da literatura que empregaram o soro de queijo e o glicerol em processos de co-digestão, como pode ser visto na Tabela 25, na qual rendimentos entre 0,12 e 21,6 mmol de  $\text{H}_2$ .gDQO<sup>-1</sup> são encontrados (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020). Cabe ressaltar também que os microrganismos utilizados neste trabalho compõem uma cultura mista e, portanto, as rotas seguidas por cada espécie podem diferir, gerando uma diversidade de produtos, além de  $\text{H}_2$ .

Utilizando reator RALF, Ramos e Silva (2018) constataram rendimento médio de 0,82 mmol de  $\text{H}_2$ .gDQO<sup>-1</sup> na co-digestão de soro de queijo com vinhaça de cana-de-açúcar, aplicando condição termofílica (55°C) e concentração afluyente de 12 gDQO.L<sup>-1</sup> (TCO 36 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Com o aumento da TCO até 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> os autores verificaram contínuo decréscimo no rendimento até a sua não detecção. Além da co-digestão com soro de queijo, Ramos e Silva (2018) estudaram a fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar, a qual também apresentou desempenho semelhante ao exibido no RA-T. No RA-T, a mudança na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> promoveu um aumento de 70% no rendimento de  $\text{H}_2$ , passando de 1,0 mmol de  $\text{H}_2$ .gDQO<sup>-1</sup> para 1,7 mmol de  $\text{H}_2$ .gDQO<sup>-1</sup>. Em seguida, ao inserir 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no reator, devido à sobrecarga de substratos e acúmulo de ácidos orgânicos, ocorreu uma queda de 53% no rendimento de  $\text{H}_2$ . Da mesma forma, Ramos e Silva (2018) identificaram que o aumento da TCO de 30 para 40 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> favoreceu o rendimento de  $\text{H}_2$ , produzindo o máximo de 1,03 mmol de  $\text{H}_2$ .gDQO<sup>-1</sup>, e, com o contínuo aumento da TCO até 240 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o rendimento decaiu em 94%, fornecendo 0,06 mmol de  $\text{H}_2$ .gDQO<sup>-1</sup>. Essa tendência no qual aumentos gradativos na TCO favoreceram o rendimento de  $\text{H}_2$  também foi observada por Ferreira et al. (2019). Estudando a fermentação de caldo de cana de açúcar em reator RALF termofílico, os autores verificaram que acréscimos na TCO beneficiaram o rendimento de  $\text{H}_2$  até a TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, apresentando rendimento máximo igual a 1,52 mol  $\text{H}_2$ .mol<sup>-1</sup>hexose. Ao inserir 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no reator,

observou-se um decaimento de 37,5% no rendimento de  $H_2$ , fornecendo  $0,95 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$ .

A co-digestão de soro de queijo e glicerina realizada por Lovato et al. (2017) em reator batelada sequencial produziu  $5,4 \text{ mmol de } H_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}$ , utilizando proporção de 75% de soro de queijo e 25% de glicerol na alimentação do reator e carregamento orgânico de  $23,9 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Como pode ser observado, este rendimento é maior do que o apresentado no RA-T. Entretanto, diferente deste estudo que adotou a mesma proporção de soro de queijo e glicerol (50%), os autores utilizaram maior proporção de soro na alimentação do reator, além de terem aplicado temperatura na faixa mesofílica. O pH mais ácido neste trabalho (pH 4,0) do que o operado por Lovato et al. (2017), também indica que os microrganismos podem ter seguido por rotas distintas a que maximiza a produção de  $H_2$ .

Além das condições operacionais impostas no processo, o tipo de reator adotado também pode influenciar significativamente o rendimento de  $H_2$ . Utilizando reator do tipo EGSB, Lopes, Ramos e Silva (2017) identificaram rendimento de  $0,120 \text{ mmol de } H_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}$  ao estudar a co-fermentação de soro de queijo e glicerol. Observa-se que este resultado foi inferior ao rendimento de  $1,7 \text{ mmol de } H_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}$  exibido neste trabalho. No entanto, assim como Lovato et al. (2017), Lopes, Ramos e Silva (2017) utilizaram reator mesofílico com uma alimentação com mais soro de queijo do que glicerol (5 g soro de queijo: 1 g glicerol). Lovato et al. (2017), Lopes, Ramos e Silva (2017) e este estudo utilizaram os mesmos co-substratos: soro de queijo e glicerol. No entanto, destaca-se aqui resultados discrepantes, no qual o rendimento de Lovato et al. (2017) foi cerca de 3,2 vezes maior do que o deste trabalho e 45 vezes mais elevado do que o de Lopes, Ramos e Silva (2017). Ao comparar o rendimento do RA-T com o rendimento fornecido no EGSB estudado por Lopes, Ramos e Silva (2017), verifica-se uma produção aproximadamente 14,2 vezes maior neste estudo. Entretanto, além da temperatura e reatores diferentes, as TCO aplicada no RA-T e no trabalho de Lopes, Ramos e Silva (2017) foram 90 e 42  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente, enquanto a adotada por Lovato et al. (2017) foi de  $23,9 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Assim sendo, a junção desses fatores pode ter colaborado para maior eficiência apresentada por Lovato et al. (2017).

Conforme apresentado na Tabela 24, a co-fermentação do soro de queijo com o glicerol apresentou um crescimento no rendimento de  $H_2$  e exibiu o melhor desempenho na concentração de  $15 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ , sendo que ao aumentar a concentração para  $20 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$  notou-se uma sobrecarga do reator, resultando em um rendimento de  $0,787 \text{ mmol de } H_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}$ . Quedas no rendimento de  $H_2$  ocasionadas por sobrecargas nos reatores têm sido relatadas por diversos autores na literatura (OTTAVIANO et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2018;

PARANHOS; SILVA, 2020). Ottaviano et al. (2017) avaliando o efeito da TCO na fermentação de soro de queijo em RALF termofílico empregaram TCO entre 12 e 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> por meio de aumentos na concentração de substrato utilizando TDH de 6 h, e verificaram máximo rendimento de 5,76 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na mais baixa TCO, observando uma queda contínua no rendimento com a aplicação de TCO maiores devido à sobrecarga do reator. Sittijunda e Reungsang (2020) estudando o efeito da TCO na fermentação de glicerol puro em UASB termofílico observaram crescimento contínuo no rendimento de H<sub>2</sub> conforme maiores TCO foram aplicadas, passando de 0,82 mol H<sub>2</sub>.mol glicerol<sup>-1</sup> em 25 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 2,9 mol H<sub>2</sub>.mol glicerol<sup>-1</sup> em 62,5 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. No entanto, ao atingir 75 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a fermentação com glicerol apresentou queda no rendimento para 1,39 mol H<sub>2</sub>.mol glicerol<sup>-1</sup>, sendo associada à mudança da rota oxidativa para rota redutiva com aumento da produção de 1,3-propanodiol. Aplicando concentração de 20 gDQO.L<sup>-1</sup> em reator batelada, Rodrigues et al. (2019) obtiveram rendimentos de 0,757 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup> utilizando cultura pura e 0,227 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup> com cultura mista a partir da fermentação de glicerol. Esses resultados são cerca de 55,5% e 86,6% inferiores ao obtido neste trabalho com a co-digestão do soro de queijo com glicerol na concentração 15 gDQO.L<sup>-1</sup>. No entanto, ao analisar o rendimento de H<sub>2</sub> do RA-T e de Rodrigues et al. (2019) obtido na mesma concentração de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>, verifica-se resultado semelhante.

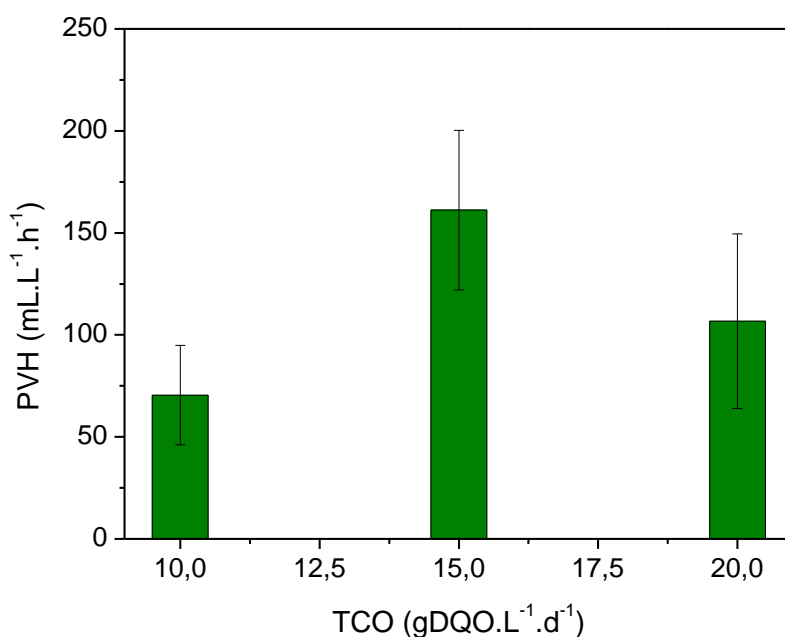
**Tabela 25** - Comparação de trabalhos que utilizaram soro de queijo e glicerol para produção de H<sub>2</sub>

Substrato	Reator	Temperatura	Inóculo	TCO ou concentração	HY (mmol H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup> )	PVH (L H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Autor
Soro de queijo	RALF	30°C	Cultura mista	20 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	1,9	2,88	(ROSA; SANTOS; SILVA, 2014)
Glicerol	UASB	37°C	Cultura mista	50 g glicerol.L <sup>-1</sup>	4,5 <sup>(a)</sup>	3,7 <sup>(a)</sup>	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017)
Soro de queijo	RALF	55°C	Cultura mista	12 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	5,8	16,6 <sup>(a,b)</sup>	(OTTAVIANO et al., 2017)
Soro + glicerina	AnSBBR	30 °C	Cultura mista	23,9 kgDQO.m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup>	5,4	3,2 <sup>(a)</sup>	(LOVATO et al., 2017)
Soro + glicerol	EGSB	30°C	Cultura mista	42 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	0,120	0,276	(LOPES; RAMOS; SILVA, 2017)
Soro de queijo	RALF	26-33°C	Cultura mista	12,34 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	5,7 <sup>(a)</sup>	0,94	(MARQUES et al., 2019)
Soro + vinhaça	RALF	55°C	Cultura mista	36 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	0,82	1,41	(RAMOS; SILVA, 2018)
Glicerol bruto	batelada	37°C	Cultura mista <i>Enterobacter</i>	20gDQO.L <sup>-1</sup>	0,757 0,227	-	(RODRIGUES et al., 2019)
Glicerol	RALF	30°C	Cultura mista	90 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	0,3	2,2 <sup>(a)</sup>	(PARANHOS; SILVA, 2020)
Glicerol	UASB	55°C	Cultura mista	62,5 g glicerol.L <sup>-1</sup>	21,6 <sup>(a)</sup>	-	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020)
Soro + Glicerol	RALF	55°C	Cultura mista	90 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	1,7	3,9	Este estudo

RALF: reator anaeróbio de leite fluidizado; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; AnSBBR: reator anaeróbio de batelada sequencial com biomassa imobilizada; EGSB: reator de leite granular expandido; <sup>a</sup>: Conversão de unidade realizada pelo autor para fins comparativos; <sup>b</sup>: 40 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>

Analisando a conversão de substratos e o rendimento de hidrogênio, pode-se relacionar a produção de hidrogênio majoritariamente à fermentação de lactose, uma vez que é possível observar a mesma tendência do consumo de carboidratos no comportamento do rendimento. Na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, cujo máximo consumo de carboidrato foi observado (51,2%), tem-se também o rendimento de H<sub>2</sub> mais elevado (1,7 mmol H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>), enquanto a TCO de 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> apresentou o menor consumo de carboidrato e rendimento (41,0% e 0,8 mmol H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>), e a TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> valores intermediários (46,6% e 1,0 mmol H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>). Ao analisar a conversão de glicerol, verifica-se um consumo semelhante em 60, 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (9,9%, 9,1% e 7,9%), e, portanto, pode-se concluir que a variação no rendimento de H<sub>2</sub> não ocorreu devido à quantidade de glicerol consumida, mas sim a uma provável mudança na rota metabólica.

Com relação à produção volumétrica de hidrogênio (PVH), a co-digestão do soro de queijo e glicerol realizada no RA-T apresentou PVH máxima de 3,9 L de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, conforme indicado na Figura 23 e Tabela 24. Confrontando este resultado com os resultados fornecidos pelos trabalhos exibidos na Tabela 25, verifica-se que o RA-T proporcionou elevado valor de PVH em comparação com demais trabalhos da literatura (ROSA; SANTOS; SILVA, 2014; LOPES; RAMOS; SILVA, 2017; LOVATO et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2018; MARQUES et al., 2019) utilizando alta taxa de carregamento orgânico, sendo a TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> superior as TCO apresentadas na Tabela 25.



**Figura 23** – Produção volumétrica de hidrogênio no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 4 h

Como foi observado no RA-T, incrementos na concentração de substratos, e por consequência, na TCO, favoreceram a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) até  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}$  (TCO  $90 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) quando ocorreu a sobrecarga do reator. Assim, com a adição de substrato à alimentação, ao atingir a concentração de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}$  ( $120 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) a PVH decaiu 33,8%. Ottaviano et al. (2017) observaram semelhante situação, na qual o acréscimo da concentração de lactose de  $2800 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $9800 \text{ mg.L}^{-1}$  com TDH fixo em 6 h, resultou em um aumento na PVH, porém, com a aplicação de concentrações mais elevadas, o reator passou a apresentar uma queda na produção de hidrogênio. Sittijunda e Reungsang (2017) estudando a fermentação de glicerol também constataram um aumento da PVH de  $1,6 \text{ mmol de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para  $6,0 \text{ mmol de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em decorrência de elevações na TCO, variando de 25 para  $50 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Posteriormente, assim como identificado no RA-T e por Ottaviano et al. (2017), incremento de carga orgânica no reator promoveu uma sobrecarga pelo excesso de substrato, o que ocasionou numa queda da PVH para  $2,6 \text{ mmol de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Ao analisar as produções volumétricas de hidrogênio dos trabalhos apresentados nas Tabelas 1 e 3 (pág. 36 e 47), verifica-se que diferentes configurações (tipo de reator, temperatura, concentração) resultaram em produções entre uma faixa de  $0,06 - 128 \text{ L de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (KARGI; EREN; OZMIHICI, 2012; RAMOS; SILVA, 2017a). Na Tabela 1, em sua maioria, as temperaturas na faixa mesofílica foram as que apresentaram os menores valores de produção volumétrica em comparação à PVH fornecida no RA-T ( $3,9 \text{ L de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ou  $143,7 \text{ mol de H}_2.\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ), permanecendo entre a faixa de  $0,06 - 1 \text{ L de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (KARGI; EREN; OZMIHICI, 2012; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012b; PERNA et al., 2013; LIMA et al., 2015; CASTELLÓ et al., 2018; SIMÕES et al., 2021).

O efeito da temperatura na fermentação de soro de queijo foi estudado por Kargi, Eren e Ozmihci (2012) em reatores batelada. Os experimentos foram realizados a  $35^\circ\text{C}$  e  $55^\circ\text{C}$ , o pH inicial foi ajustado para 7 e a concentração fixada em  $10,77 \text{ g de açúcar.L}^{-1}$ . O reator termofílico se mostrou mais apropriado para a fermentação do soro, apresentando os maiores resultados para produção cumulativa de hidrogênio (171 mL), rendimento ( $0,81 \text{ mol de H}_2.\text{mol de glicose}^{-1}$ ) e produção volumétrica de  $\text{H}_2$  ( $3,46 \text{ mL de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) quando comparada ao reator mesofílico ( $103 \text{ mL de H}_2$ ,  $0,47 \text{ mol de H}_2.\text{mol de glicose}^{-1}$  e  $2,38 \text{ mL de H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Comparando os resultados de Ottaviano et al. (2017) e Rosa, Santos e Silva (2014) apresentados na Tabela 25 também se verifica que, na fermentação de soro, a temperatura na faixa termofílica (OTTAVIANO et al., 2017) produziu maior rendimento e produção volumétrica em TCO mais elevada do que a temperatura na faixa mesofílica (ROSA; SANTOS; SILVA, 2014). O mesmo comportamento pode ser observado na fermentação de



glicerol analisando o trabalho de Sittijunda e Reungsang (2020) e Sittijunda e Reungsang (2017), no qual a fermentação à 55 °C (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020) produziu rendimento 5 vezes maior do à 37 °C (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017).

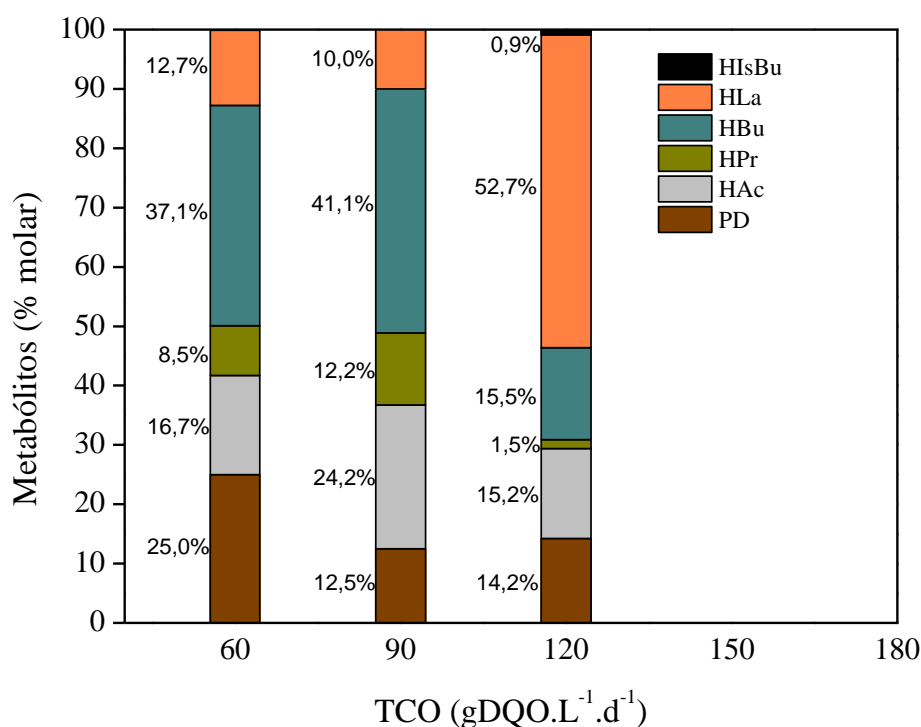
Ainda analisando os resultados fornecidos nas Tabelas 1 e 3, observou-se que, a configuração do reator quanto ao modo de operação, contínuo ou batelada, não apresentou um padrão de comportamento, já que resultados bem discrepantes foram exibidos pelo mesmo tipo de reator, apesar de reatores com maior agitação fornecerem um maior desprendimento do gás no líquido. Entretanto, deve-se levar em consideração a influência do tipo de inóculo, a faixa de pH aplicada, o meio nutricional, dentre outros fatores que afetam diretamente a fermentação do soro de queijo e do glicerol.

#### 4.2.2. Metabólitos solúveis – RA-T

Na Tabela 26 são apresentados os metabólitos produzidos no RA-T para as TCO de 60 a 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, com suas respectivas concentrações e porcentagens molares no efluente. Verifica-se que a co-fermentação de soro de queijo e glicerol resultou nos seguintes produtos solúveis: HBU (15,5 – 41,1%), HAc (15,2 – 24,2%), 1,3-propanodiol (PD) (12,5 – 25,0%), HLa (10,0 – 52,7%), HPr (1,5 – 12,2%) e HIsBu (0,0 – 0,9%), conforme indicado na Figura 24.

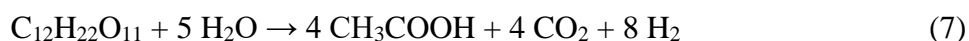
**Tabela 26** - Principais metabólitos produzidos no RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>

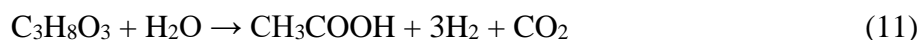
Metabólito	Fase 1 (60 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )		Fase 2 (90 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )		Fase 3 (120 gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	
	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	% molar	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	% molar	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	% molar
PD	422,2 ± 129,5	25,0	371,2 ± 125,2	12,5	370,4 ± 65,3	14,2
HAc	222,9 ± 59,1	16,7	564,8 ± 137,8	24,2	311,7 ± 115,3	15,2
HPr	139,1 ± 64,3	8,5	350,9 ± 98,5	12,2	38,2 ± 23,8	1,5
HBU	727,3 ± 308,2	37,1	1409,6 ± 524,6	41,1	466,3 ± 290,8	15,5
HIsBu	-	-	-	-	26,1 ± 13,8	0,9
HLa	255,2 ± 117,4	12,7	352,0 ± 239,9	10,0	1624,9 ± 673,0	52,7



**Figura 24** - Distribuição dos metabólitos (porcentagem molar) do RA-T nas TCO de 60 a 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 4 h.

Nas TCO de 60 e 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a produção de HAc e HBU somaram juntas 53,8 e 65,3% da produção molar total dos metabólitos, indicando a predominância das rotas acética e butírica. No entanto, o HBU foi o que apresentou maior proporção, 37,1 e 41,1%, as quais corresponderam às concentrações de 727,3 mg.L<sup>-1</sup> e 1409,6 mg.L<sup>-1</sup> para as TCO de 60 e 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. A concentração de ácido acético nas mesmas condições (60 e 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi 222,9 mg.L<sup>-1</sup> e 564,8 mg.L<sup>-1</sup>, com parcelas de 16,7% e 24,2% da produção molar. Lovato et al. (2017) observaram que com o aumento da proporção de glicerol na co-fermentação com soro, a parcela molar de ácido acético diminuiu de 40,8% (100% soro) para 15,3% (25% soro, 75% glicerol), enquanto a porcentagem de ácido butírico foi de 35,0% para 30,2%, verificando uma mudança na rota preferencialmente acética para rota butírica com a adição de glicerol. Sabe-se que a produção de hidrogênio por meio da fermentação de soro de queijo e glicerol está associada à produção de ácido acético e ácido butírico de acordo com as Equações 7, 8, 11 e 13.





Observa-se comumente a produção de  $\text{H}_2$  associada a produção majoritária de ácido butírico e acético (CASTELLÓ et al., 2018; BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019; SILVA et al., 2020; CHEN; YIN; WANG, 2021). Perna et al. (2013) estudando a fermentação de soro de queijo identificaram ácido butírico como principal metabólito quando foram atingidos os maiores rendimentos de  $\text{H}_2$ . Utilizando reator AnSBBR, Lima et al. (2016) e Silva et al. (2020) também verificaram ácido acético e ácido butírico como os ácidos orgânicos mais produzidos ao avaliar a fermentação de soro de queijo e glicerol bruto, respectivamente. Ottaviano et al. (2017) aplicando concentrações de lactose de 2800-9800  $\text{mg.L}^{-1}$  verificaram como principais metabólitos na fermentação de soro de queijo HAc (47,5 a 49,3%) e HBU (36,6 a 42,1%).

Examinando os rendimentos de hidrogênio, observa-se que na TCO de 90  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , cujo rendimento foi de 1,7  $\text{mmol de H}_2.\text{gDQO}^{-1}$ , a concentração de HBU e HAc foi aproximadamente 1,9 e 2,5 vezes maior do que na TCO de 60  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , na qual 1,0  $\text{mmol de H}_2.\text{gDQO}^{-1}$  foi produzido.

Além das maiores produções de ácido butírico e ácido acético, também verifica-se na TCO de 90  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  produção de 1,3-propanodiol (PD) igual a 371,2  $\text{mg.L}^{-1}$  (12,5% da produção molar total), enquanto na TCO de 60  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  foram produzidos 422,2  $\text{mg.L}^{-1}$  de PD, equivalente a 25,0% dos metabólitos. Assim, atesta-se que, enquanto na TCO de 90  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  a conversão dos substratos foi direcionada para a produção de  $\text{H}_2$  com a predominância das rotas butírica e acética, na TCO de 60  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , os microrganismos seguiram preferencialmente pela rota do ácido butírico (com 37,1% da produção molar) e pela via redutora do glicerol, devido à elevada proporção de PD em relação as demais fases (25,0%). A produção do metabólito PD não é interessante no processo fermentativo quando o principal objetivo é a recuperação de  $\text{H}_2$ , já que na reação química que sintetiza esse composto ocorre o consumo de hidrogênio, conforme indicado na Equação 20.



Maiores produções de PD são comumente associadas à aplicação de elevadas quantidades de glicerol no reator (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020). Sittijunda e Reungsang (2020) observaram acréscimo na concentração de PD de 58,07 para 98,28  $\text{mmol.L}^{-1}$  ao aumentar a TCO de 25 para 75  $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  na fermentação de glicerol. Neste estudo, o aumento

da quantidade de glicerol no reator e acréscimo na TCO não favoreceram a produção de PD. Ao contrário, verifica-se uma queda de PD de 422,2 para 371,2 mgPD.L<sup>-1</sup> com o aumento da TCO de 60 para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, e posterior estabilização com 370,4 mgPD.L<sup>-1</sup> em 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Ainda assim, observa-se que a conversão do glicerol a PD foi de aproximadamente 100, 74 e 58% do glicerol consumido nas TCO de 60, 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. Dessa forma, apesar do aumento da TCO ter diminuído a conversão de glicerol pela rota redutiva, verifica-se uma elevada parcela (> 50%) desse substrato sendo direcionada para formação de produtos prejudiciais a produção de H<sub>2</sub>.

Com relação ao ácido propiônico (HPr), verifica-se que com o acréscimo na TCO de 60 para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, houve um aumento na concentração de 139,1 mg.L<sup>-1</sup> para 350,9 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, apesar da concentração desse composto ser cerca de 2 vezes maior na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, observa-se que na questão proporção, foram obtidos valores próximos, sendo a parcela de HPr ligeiramente maior nessa TCO do que com 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, passando de 8,4 para 12,2%. A rota para produção de HPr é uma rota desvantajosa para produção de hidrogênio, pois para formação de HPr por meio da fermentação de soro é necessário que haja consumo de H<sub>2</sub>, e por meio da fermentação de glicerol tem-se uma produção nula de H<sub>2</sub>. No entanto, as proporções determinadas no RA-T se assimilam as verificadas na literatura (LOVATO et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2018). Ramos e Silva (2018) estudando co-fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo em RALF observaram proporções de HPr entre 4,0-8,7%.

Assim como aconteceu com o ácido propiônico, o ácido láctico (HLA) também não apresentou proporções muito diferentes na TCO de 60 e 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, com médias de 10,0 a 12,7% e concentrações de 255,2 e 352,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A formação de HLa não promove o consumo nem a produção de H<sub>2</sub>, fornecendo saldo nulo de H<sub>2</sub> quando este ácido é metabolizado. Entretanto, a presença de HLa não é desejável no processo, pois pode ocorrer uma competição pelo substrato entre as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) e as bactérias produtoras de hidrogênio, e, além disso, as LAB são capazes de produzir substâncias tóxicas às bactérias produtoras de H<sub>2</sub> (NOIKE, 2002; CASTELLÓ et al., 2020).

Na TCO de 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> observou-se um comportamento diferente do apresentado nas TCO de 60 e 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Enquanto nas TCO de 60 e 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, 53,8% e 65,3% dos metabólitos foram compostos por substâncias que indicam a predominância de rotas favoráveis a produção de H<sub>2</sub> (ácido acético e ácido butírico), na TCO de 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, cerca de 68,4% dos metabólitos são produtos de rotas desfavoráveis e prejudiciais a produção de hidrogênio (1,3-propanodiol, ácido propiônico e ácido láctico).

Destaca-se na TCO de 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a concentração de HLa, 1624,9 mg.L<sup>-1</sup>, compondo 52,7% dos metabólitos. Castelló et al. (2020) apontam que a presença de LAB pode ser benéfica à produção de H<sub>2</sub>, pois o lactato pode atuar como substrato extra utilizado junto ao acetato para produzir H<sub>2</sub> por certos microrganismos. No entanto, de acordo com Castelló et al. (2018), a concentração limite na qual é possível que ocorra esse comportamento é 650 mgHLA.L<sup>-1</sup>. Dessa maneira, é possível associar o baixo rendimento de hidrogênio desta fase (0,8 mmol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup>) à elevada concentração de HLa (2,5 vezes maior do que a concentração tolerável) e ao fato dos substratos terem sido utilizados por bactérias produtoras de lático ao invés de bactérias produtoras de hidrogênio. Conforme exposto na Figura 24, o ácido lático ocupou uma parcela muito maior na distribuição de metabólitos na TCO de 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (52,7%) do que nas demais TCO (12,7% e 10,0%). Também é possível observar como a fração de ácido butírico e ácido acético se tornam menores na maior TCO, somando 31,6% dos metabólitos.

De maneira geral, na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o menor rendimento de H<sub>2</sub> pode ser associado à elevada quantidade de PD produzida e a preferência pela rota reductiva do glicerol, resultando em menores concentrações de HBU e HAc, enquanto na TCO de 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o menor rendimento está ligado ao deslocamento do consumo de substratos para produção de HLa.

#### 4.2.3. Balanço de DQO no RA-T

O balanço de DQO no RA-T foi realizado para cada TCO estudada e os seus respectivos resultados encontram-se na Tabela 27. A DQO equivalente de cada composto do efluente foi calculada baseando-se nas reações de oxidação dos metabólitos e demais componentes orgânicos. A concentração de sólidos voláteis (SSV) nas TCO de 60, 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi de 386,5 ± 102,1 mg.L<sup>-1</sup>, 628,8 ± 192,2 mg.L<sup>-1</sup> e 280,3 ± 145,3 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Fazendo o balanço de DQO efetuando a diferença entre a DQO medida no efluente do reator (DQO<sub>Eex</sub>) e a soma da DQO equivalente de cada componente identificado no efluente (DQO<sub>Eeq</sub>) (metabólitos, SSV, carboidrato e glicerol não consumidos), verifica-se que nas TCO de 60 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a porção de DQO não identificada correspondeu a 3,0 e 3,2%, respectivamente. Já com 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a parcela discriminada ultrapassou em 5,8% a DQO medida. Esses valores podem ser justificados por erros nas medidas, considerando que os dados apresentados nesse estudo são médias e contém, por exemplo, o erro do equipamento. Além disso, a diferença entre a DQO medida no efluente e a obtida pelos cálculos pode ser atribuída a não detecção de outros metabólitos orgânicos pelo cromatógrafo utilizado.

As DQO equivalentes dos ácidos acético e butírico na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> compõem, respectivamente, 3,8 e 16,1% da DQO afluyente. O rendimento de hidrogênio fornecido no RA-T foi 7,1% do rendimento teórico calculado baseando-se somente na rota do ácido acético. Dessa forma, verifica-se que o rendimento medido no RA-T está coerente com a produção de metabólitos favoráveis à produção de H<sub>2</sub>.

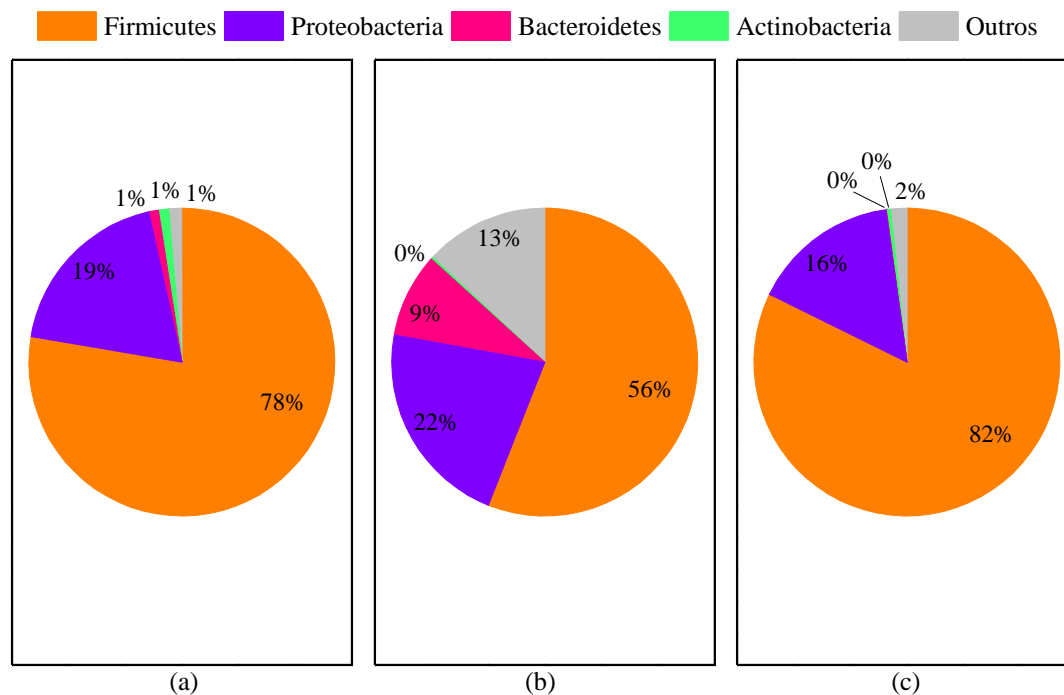
**Tabela 27** – Balanço de DQO no RA-T

<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>120</b>
<b>SSV (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	519,0	844,4	376,4
<b>% SSV</b>	4,9	5,5	1,8
<b>HAc (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	238,5	604,3	333,6
<b>% HAc</b>	2,2	4,0	1,6
<b>HBu (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	1323,7	2565,4	848,7
<b>% HBu</b>	12,5	16,9	4,1
<b>Ácido HIsBu (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	NI	NI	47,5
<b>% HIsBu</b>	NI	NI	0,2
<b>HPr (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	210,0	529,9	57,7
<b>% HPr</b>	2,0	3,5	0,3
<b>HLa (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	273,0	376,7	1738,6
<b>% HLa</b>	2,6	2,5	8,5
<b>PD</b>	886,7	779,5	777,9
<b>% PD</b>	8,3	5,1	3,8
<b>Carboidrato efluente</b>	2181,0	2975,7	4799,1
<b>% Carboidrato</b>	20,5	19,6	23,4
<b>Glicerol efluente</b>	4657,0	7426,6	10955,5
<b>% Glicerol</b>	43,8	48,8	53,3
<b>DQO<sub>Ex</sub></b>	10631,0	15218,8	20544,3
<b>DQO<sub>Eq</sub></b>	10289,0	16102,6	19935,0
<b>DQO<sub>Ex</sub> – DQO<sub>Eq</sub> (%)</b>	3,2	-5,8	3,0

SSV: sólidos suspensos voláteis; HAc: ácido acético; HBu: ácido butírico; HIsBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HLa: ácido lático; PD: 1,3-propanodiol

#### 4.2.4. Análise da comunidade microbiana do RA-T

As análises microbiológicas foram realizadas nas três condições impostas no RA-T: 60, 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, classificando as bactérias a nível de filo, classe, ordem, família e gênero. Os filamentos cujo a abundância relativa foi maior do que 1,0% são apresentados na Figura 25.

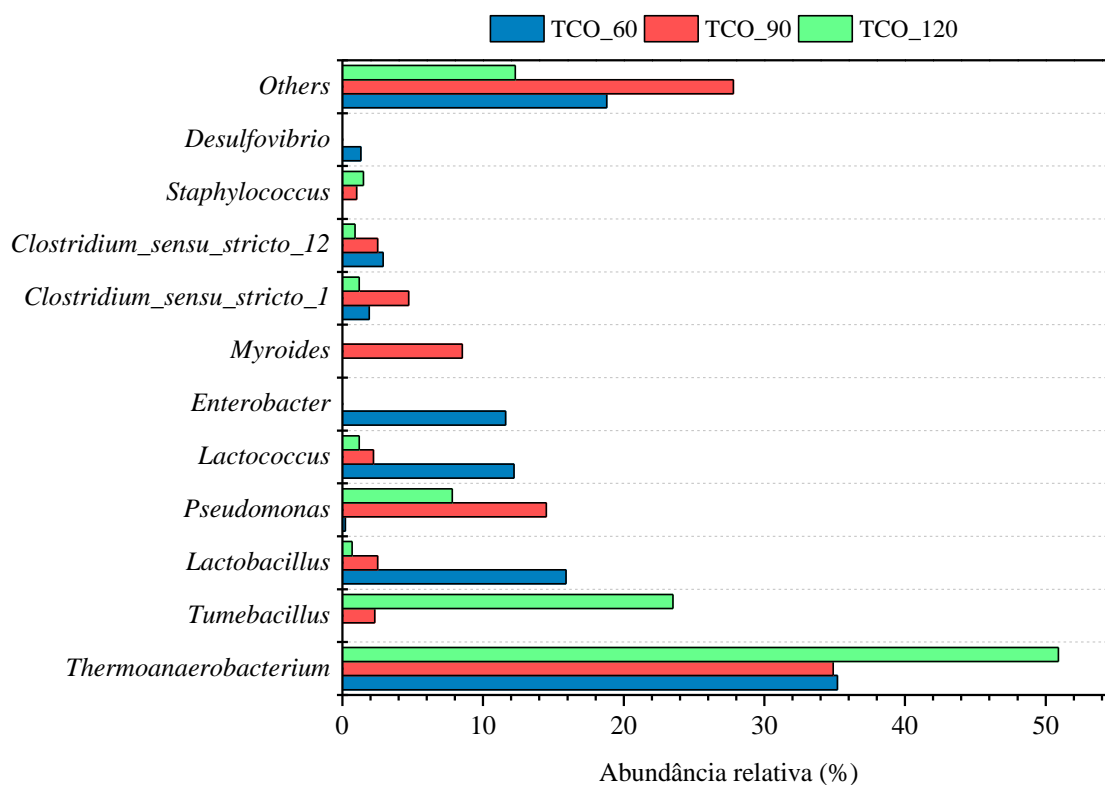


**Figura 25** - Abundância relativa (%) dos filamentos detectados no RA-T nas TCO de (a)60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, (b) 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e (c) 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>

Aumentando a TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> observa-se uma mudança na composição da população bacteriana, com a abundância relativa do filo *Firmicutes* diminuindo de 78% para 56% e crescimento do filo *Bacteroidetes* de 1% para 9%. Aplicando 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, não foram detectadas bactérias do filo *Bacteroidetes*, e o filo *Firmicutes* apresentou um aumento na abundância relativa para 82%. Apesar das alterações na microbiota do reator causadas pela elevação da TCO, o filo *Firmicutes* foi o mais abundante em todas as condições avaliadas, seguido do filo *Proteobacteria*, o qual apresentou abundância relativa entre 9-19% para o intervalo de 60 à 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Na literatura, o filo *Firmicutes* é o mais usualmente identificado em reatores acidogênicos, sendo associado à produção de H<sub>2</sub> (OTTAVIANO et al., 2017).

Analisando a diversidade microbiana nas TCO que produziram o maior e menor rendimento de  $H_2$ , ou seja,  $90 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ( $1,7 \text{ mmol H}_2.\text{gDQO}^{-1}$ ) e  $120 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ( $0,8 \text{ mmol H}_2.\text{gDQO}^{-1}$ ), verifica-se Índice de Shannon 4,261 e 3,040, e Índice de Simpson 0,898 e 0,781. Dessa forma, observa-se maior diversidade de bactérias na TCO que produziu o mais alto rendimento. Tal fato pode indicar o estabelecimento de sintrofismo microbiano entre as diferentes espécies para converter os substratos à  $H_2$ . Ferreira et al. (2019) utilizando RALF mesofílico para fermentação de caldo de cana-de-açúcar observaram produção de  $H_2$  somente nas condições que exibiram maiores diversidades microbianas, associando este comportamento à seleção de diferentes grupos bacterianos que instituíram um relacionamento sintrófico. No entanto, ao utilizar temperatura na faixa termofílica, os autores verificaram rendimento de  $H_2$  mais alto na condição cujo a diversidade foi a mais baixa e a dominância de espécies a mais elevada, indicando a seleção de microrganismos produtores de  $H_2$ .

Assim como realizado na determinação dos principais filos, na Figura 26 são apresentados os gêneros cuja abundância relativa foi superior a 1,0% nas TCO de 60, 90 e  $120 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ .



**Figura 26** - Abundância relativa (%) dos gêneros bacterianos presentes no RA-T nas TCO de  $60 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ,  $90 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $120 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$



O gênero *Thermoanaerobacterium* foi o que exibiu abundância relativa mais elevada durante toda a operação. Com o aumento da TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a parcela de *Thermoanaerobacterium* em relação aos demais gêneros bacterianos se manteve estável, variando de 35,22% para 34,92%. Entretanto, com o acréscimo para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> observa-se a seleção desses microrganismos, passando a apresentar abundância relativa de 50,91%. *Thermoanaerobacterium* são bactérias estritamente anaeróbias termofílicas associadas à produção de hidrogênio tanto pela fermentação de soro e lactose (SARIPAN; REUNGSANG, 2013; OTTAVIANO et al., 2017) quanto do glicerol (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020). Além de *Thermoanaerobacterium*, também foram identificadas nas TCO de 60, 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> bactérias do gênero *Clostridium sensu stricto 1* e *Clostridium sensu stricto 12*. Observa-se que a abundância relativa dos microrganismos *Clostridium sensu stricto 1* exibiu um comportamento semelhante ao rendimento, ou seja, com o aumento na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, observa-se um acréscimo na abundância relativa de *Clostridium sensu stricto 1* de 1,9% para 4,7%, assim como ocorreu com o rendimento (1,0 para 1,7 mmol H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>). Ao aumentar a TCO para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a abundância relativa de *Clostridium sensu stricto 1* decaiu para 1,2%, sendo também acompanhada por uma queda no rendimento (0,8 mmol H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>). Analisando o comportamento das bactérias *Clostridium sensu stricto 12* também é possível observar um decréscimo na abundância relativa desses microrganismos (2,5% para 0,9%) com a variação da TCO de 90 para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Assim, pode-se relacionar os menores rendimentos observados em 60 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> as menores abundâncias relativas das bactérias *Clostridium* no reator. Vilela et al. (2019) investigaram a fermentação de melaço de cana de açúcar e observaram ao mudar a TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> um aumento de *Thermoanaerobacterium* e um decréscimo de *Clostridium sensu stricto 12*, sendo identificado também queda no rendimento, sugerindo que *Clostridium sensu stricto 12* estavam envolvidas na produção de hidrogênio. O gênero *Clostridium* é considerado o mais eficiente produtor de H<sub>2</sub>, sendo capaz de realizar seu metabolismo para produção de H<sub>2</sub> tanto pela via acética quanto pela via butírica (CABROL et al., 2017; CASTELLÓ et al., 2020). Na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, os principais metabólitos determinados foram ácido butírico e ácido acético, estando de acordo com a atividade metabólica do gênero *Clostridium*.

Ainda foram identificados no RA-T os gêneros *Enterobacter* e *Pseudomonas*, os quais são microrganismos anaeróbios facultativos também associados à produção de hidrogênio (CABROL et al., 2017). As bactérias do gênero *Enterobacter* são conhecidas por apresentar elevados rendimentos de H<sub>2</sub> (ALVAREZ-GUZMÁN et al., 2020), sendo verificada a aplicação

de bactérias desse gênero tanto na fermentação de soro (ALVAREZ-GUZMÁN et al., 2020; RAO; BASAK, 2021) como de glicerol (REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013; PAIDERS et al., 2017). No entanto, de acordo com Cabrol et al. (2017), quando o gênero *Enterobacter* encontra-se junto à microrganismos estritamente anaeróbios ocorre uma colaboração das *Enterobacter* na produção de H<sub>2</sub>, porém, essas bactérias não são as principais responsáveis pela produção. *Enterobacter* foram observadas apenas na primeira condição de operação, ou seja, na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, sendo que o aumento na taxa de carregamento desfavoreceu o crescimento desse gênero, não sendo identificado nas demais condições operacionais. Em contrapartida, o gênero *Pseudomonas* foi detectado com baixa abundância relativa na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (0,2%), sendo observado crescimento para 14,5% na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e posterior decréscimo para 7,8% em 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Devido a sua capacidade hidrolítica, as *Pseudomonas* geralmente são encontradas na fermentação de materiais lignocelulósicos (CABROL et al., 2017). Fontana et al. (2018a) estudaram a fermentação de soro em reator CSTR e associaram elevadas concentrações de butirato ao metabolismo de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Dessa maneira, a alta concentração de ácido butírico na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (1409,6 mgHBu.L<sup>-1</sup>) pode ser explicada pela presença de *Pseudomonas* nesta condição. De forma geral, verifica-se que a TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, nas qual o rendimento e PVH mais elevados da operação foram observados, foi composta majoritariamente por bactérias de gêneros favoráveis a produção de hidrogênio: *Thermoanaerobacterium*, *Clostridium* e *Pseudomonas*.

Apesar de ter sido detectada produção de hidrogênio durante toda a operação do RA-T, sabe-se que na TCO de 60 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, houve um menor desempenho do que em 90 DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o qual pode ser explicado ao analisar os demais microrganismos detectados na comunidade microbiana presente no reator. Bactérias produtoras de ácido lático (LAB) *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* foram identificadas em todas as fases avaliadas no reator, justificando a produção deste metabólito durante a operação. No entanto, nota-se maior presença de LAB na TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, conforme indicado na Figura 26. Assim, em 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus* apresentaram abundância relativa de 15,93% e 12,17%, respectivamente, enquanto na amostra de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a abundância relativa de *Lactobacillus* e *Lactococcus* foi de 2,57% e 2,19% e de *Streptococcus* 1,25%. Em 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, observa-se presença menos expressiva desse tipo de bactéria, com parcelas de 0,71%, 1,16% e 0,95% para *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, respectivamente. A presença de LAB não é interessante para recuperação de H<sub>2</sub>, pois essas bactérias competem pelo substrato e podem inibir as bactérias produtoras de hidrogênio com a

produção de compostos tóxicos (CASTELLÓ et al., 2020). *Lactobacillus* também são reportadas na literatura como produtoras de hidrogênio na fermentação de soro (YANG et al., 2007), sendo observado altos rendimentos de hidrogênio mesmo na presença de ácido láctico. Tal fato estaria de acordo com os resultados verificados neste estudo, no qual elevado rendimento foi identificado na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> junto a concentração de ácido láctico de 352,0 mgHLA.L<sup>-1</sup>.

As bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Enterobacter* são gêneros que, além de metabolizar H<sub>2</sub>, também foram reportados na literatura como microrganismos capazes de produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol (BARBIRATO et al., 1995; BIEBL et al., 1999; PFLÜGL et al., 2012; LEE; JUNG; OH, 2018). Conforme descrito anteriormente, a produção de 1,3-propanodiol (PD) requer o consumo de H<sub>2</sub>, e, portanto, não é desejável que os microrganismos sigam pela rota redutiva do glicerol. Como na TCO de 90 e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram verificadas menores produções de PD (12,5 e 14,2%), compreende-se que a maior produção de PD observada em 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (25,0%) esteja ligada às bactérias *Enterobacter*, as quais foram identificadas somente na amostra de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, e as *Lactobacillus* que apresentaram maior abundância relativa em 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (15,9%) do que em 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (2,5%) e 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (0,7%).

Em 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, verifica-se o menor rendimento da operação e também a maior concentração de ácido láctico (52,7% dos metabólitos). Nesta TCO os gêneros mais abundantes foram: *Thermoanaerobacterium* (50,91%) e *Tumebacillus* (23,56%). Como descrito por Saripan e Reungsang (2013), o gênero *Thermoanaerobacterium* também é capaz de metabolizar lactato. Li et al. (2010) avaliando a fermentação de glicose/xilose utilizando bactéria do gênero *Thermoanaerobacterium* (*Thermoanaerobacterium aotearoense*) e concentrações de substrato entre 10-20 g.L<sup>-1</sup> relataram baixos rendimentos de hidrogênio com lactato ocupando a maior parcela dos metabólitos líquidos (38-63%). Assim, a elevada concentração de substratos pode ter induzido a produção de ácido láctico por esses microrganismos. Também foi detectado nesta TCO a presença de LABs, como *Lactococcus* (1,16%), *Streptococcus* (0,95%) e *Lactobacillus* (0,71%), que colaboram para o consumo de substratos para produção de ácido láctico ao invés de hidrogênio e que podem liberar compostos tóxicos que diminuem ou cessam a produção de hidrogênio (CASTELLO et al., 2020). A presença do gênero *Tumebacillus* também pode ter desfavorecido a produção de H<sub>2</sub>, no entanto, não se encontra na literatura informações a respeito deste gênero na fermentação de glicerol e soro. Bactérias do gênero *Tumebacillus* foram identificadas em água residuária de mandioca (WANG et al., 2013), solos (KIM; KIM, 2016) e em fermentação de glicose (LU et al., 2020).

Lu et al. (2020) avaliando a fermentação de glicose com biocarvão de casca de arroz, identificaram na batelada referente a um longo prazo de fermentação o domínio de bactérias *Clostridium sensu stricto 11* e *Tumebacillus* no sobrenadante e de *Clostridium sensu stricto 11*, *Sporolactobacillus spathodeae*, *Pseudomonas*, e *Tumebacillus* no biofilme do biocarvão. Entretanto, os autores não descreveram os metabólitos produzidos. Vilela et al. (2019) detectaram *Tumebacillus* e *Alicyclobacillus*, bactérias aeróbias formadoras de esporos da família *Alicyclobacillaceae*, no inóculo composto por lodo anaeróbio de reator UASB termofílico tratando vinhaça de cana-de-açúcar, semelhante ao aplicado neste estudo. Tal fato poderia justificar a presença desses microrganismos no RA-T.

Diante dos resultados apresentados neste estudo é possível verificar a influência da TCO no desempenho do reator, sendo o aumento da TCO de 60 para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> responsável por mudanças na comunidade microbiana. No RA-T, com o acréscimo de 60 para 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> não foi observado uma considerável variação na proporção de *Thermoanaerobacterium* em relação aos demais gêneros. No entanto, verifica-se na TCO 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> uma maior abundância relativa de microrganismos produtores de 1,3-propanodiol e ácido láctico, estando de acordo com a maior parcela de 1,3-propanodiol no efluente e o baixo rendimento de H<sub>2</sub> nesta condição. Já na TCO de 90 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> têm-se um acréscimo do gênero *Clostridium*, resultando em rendimento de H<sub>2</sub> mais elevado, maior proporção de HAC (decorrente da rota acética para produção de H<sub>2</sub>) e menores parcelas de PD e HLa em relação à TCO de 60 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Com o aumento de 90 para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> atesta-se uma seleção de *Thermoanaerobacterium*, entretanto a produção de HLa foi favorecida sobrepondo a produção de H<sub>2</sub>. Também foi identificado um decréscimo nos gêneros *Clostridium* e *Pseudomonas*, o que justificaria a queda no rendimento e nos metabólitos HAC e HBu.

#### **4.3. Processo em dois estágios - reatores Metanogênicos Sequenciais Termofílico e Mesofílico (RS-T e RS-M)**

Os reatores metanogênicos do processo em dois estágios, denominados reatores metanogênicos sequenciais, foram alimentados com o efluente do reator acidogênico RA-T. O pH operacional de cada reator em suas respectivas fases encontra-se na Tabela 28. De maneira semelhante ao que ocorreu no reator metanogênico termofílico RU-T, o pH dos reatores metanogênicos sequenciais não sofreu grandes variações em decorrência do aumento na TCO. Assim, o pH do RS-T oscilou entre 7,6 e 8,3 e o pH do RS-M variou entre 7,7 e 8,5 quando acréscimos de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram realizados. Da mesma forma como

se sucedeu com o RU-T, bicarbonato de sódio na razão 0,4 – 1,0 g de  $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{gDQO}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  foi adicionado no período inicial ( $2 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) para auxiliar no tamponamento do pH, e, posteriormente, 0,4 – 0,5 g de  $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{gDQO}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  foi inserido junto ao afluente dos reatores. As razões AI/AP e o valor de AOV no efluente de cada fase dos reatores metanogênicos sequenciais RS-T e RS-M estão presentes na Tabela 28.

**Tabela 28** - pH reacional, ácidos orgânicos voláteis e razão AI/AP dos reatores RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20  $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e TDH de 24 h

<b>Reator metanogênico sequencial termofílico - RS-T</b>				
<b>Fase</b>	<b>TCO (<math>\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}</math>)</b>	<b>pH</b>	<b>AOV (<math>\text{mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}</math>) (mínimo-máximo)</b>	<b>AI/AP (mínimo-máximo)</b>
1	2	$7,6 \pm 0,3$	55 – 231	0,36 – 0,78
2	5	$8,0 \pm 0,1$	44 – 244	0,22 – 0,55
3	7,5	$8,1 \pm 0,2$	89 – 202	0,22 – 0,40
4	10	$8,3 \pm 0,3$	81 – 97	0,21 – 0,31
5	15	$8,1 \pm 0,2$	155 – 172	0,29 – 0,39
6	20	$8,0 \pm 0,3$	129 – 619	0,30 – 0,42
<b>Reator metanogênico sequencial mesofílico - RS-M</b>				
<b>Fase</b>	<b>TCO (<math>\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}</math>)</b>	<b>pH</b>	<b>AOV (<math>\text{mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}</math>) (mínimo-máximo)</b>	<b>AI/AP (mínimo-máximo)</b>
1	2	$7,7 \pm 0,2$	44 – 257	0,34 – 0,82
2	5	$8,3 \pm 0,2$	44 – 544	0,37 – 0,61
3	7,5	$8,2 \pm 0,3$	89 – 169	0,26 – 0,32
4	10	$8,5 \pm 0,4$	73 – 112	0,20 – 0,26
5	15	$8,0 \pm 0,3$	146 – 404	0,37 – 0,40
6	20	$8,0 \pm 0,4$	241 – 843	0,28 – 0,37

Observa-se na Tabela 28 que os reatores metanogênicos do processo em dois estágios apresentaram em seus efluentes concentrações de ácidos orgânicos voláteis entre  $44 \text{ mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $843 \text{ mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}$ , sendo, portanto, concentrações inferiores às acumuladas pelo reator metanogênico de um estágio, o qual apresentou de 89 a  $1979 \text{ mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}$  no estudo do efeito da concentração. No reator termofílico RS-T verifica-se AOV na faixa de 44 a  $619 \text{ mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}$ , aplicando TCO de 2 à  $20 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Na TCO de  $10 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , as concentrações de AOV variaram de 81 a  $97 \text{ mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}$ , sendo essas as menores quantidades de ácidos acumulados dentre todas as fases. A mudança na TCO de 10 para  $20 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  aumentou a concentração de AOV em até 6,4 vezes, exibindo  $619 \text{ mgHAc} \cdot \text{L}^{-1}$ . No entanto, apesar das quantidades de AOV acumulados, o RS-T operou de maneira estável, como pode

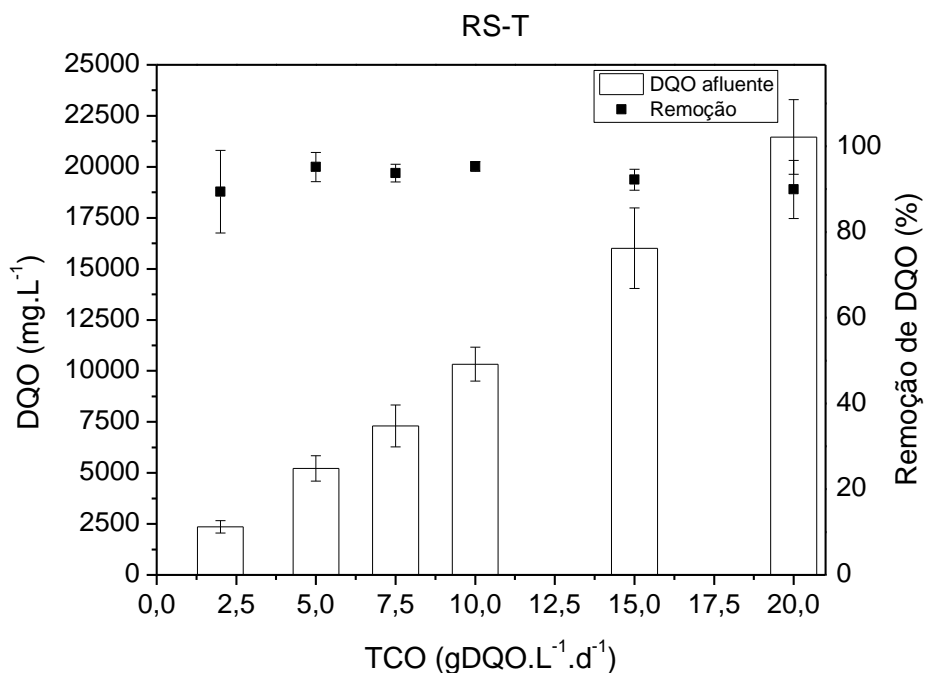
ser comprovado pela razão AI/AP fornecida na Tabela 28, a qual se manteve próxima ao valor 0,3 indicado por Ripley, Boyle e Converse (1986).

Assim como o RS-T, o RS-M também se manteve estável ao longo deste estudo, averiguando-se concentrações de ácidos entre 44 e 843 mgHAc.L<sup>-1</sup>. Entretanto, destaca-se que na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o RS-M apresentou concentração máxima de 544 mgHAc.L<sup>-1</sup>, 2 vezes maior do que a observada no RS-T, e próxima à concentração fornecida no RU-T, 533 mgHAc.L<sup>-1</sup>. As TCO de 15 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram responsáveis por concentrações máximas de 404 mg.L<sup>-1</sup> e 843 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, aumentando em 3,6 e 7,5 vezes a quantidade de ácidos orgânicos em relação a observada na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Este acréscimo de ácidos no reator resultou em um decréscimo no pH de 8,5 para 8,0. No entanto, a concentração de AOV determinada no RS-M não afetou a estabilidade do reator, já que razões AI/AP próximas a 0,3 e remoções de DQO próximas a 90% foram observadas.

Os reatores sequenciais foram submetidos às mesmas variações de concentração, 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>, e ao mesmo TDH de 24 h durante toda a operação, diferenciando-se um do outro pela temperatura na qual o processo ocorreu, sendo que o reator sequencial termofílico (RS-T) foi mantido a 55°C e o reator sequencial mesofílico (RS-M) a temperatura ambiente (temperatura ambiente média de 22 °C no período de operação). A duração da operação foi de 532 dias para os dois reatores, sendo a fase 1 composta por 71 dias, a fase 2 por 69 dias, a fase 3 por 106 dias, a fase 4 durou 84 dias, a fase 5 foi de 95 dias e a fase 6, 107 dias. Na Tabela 29 e Figura 27 são apresentadas as remoções de DQO no RS-T para as TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Observa-se que com a variação na TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a remoção de DQO aumentou de 89,4% para 95,3%. Entretanto, contínuos acréscimos na TCO provocaram quedas na degradação da matéria orgânica, reduzindo para 89,9% a remoção de DQO ao aumentar a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

**Tabela 29** – DQO afluente e remoção de DQO no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

<b>Reator metanogênico sequencial termofílico – RS-T</b>			
<b>Fase</b>	<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração afluente (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Remoção de DQO (%)</b>
<b>1</b>	2	2.361,1 ± 300,8	89,4
<b>2</b>	5	5.221,8 ± 617,5	95,2
<b>3</b>	7,5	7.301,4 ± 1.022,2	93,7
<b>4</b>	10	10.330,8 ± 836,3	95,3
<b>5</b>	15	16.009,2 ± 1.974,2	92,2
<b>6</b>	20	21.460,9 ± 1.828,0	89,9



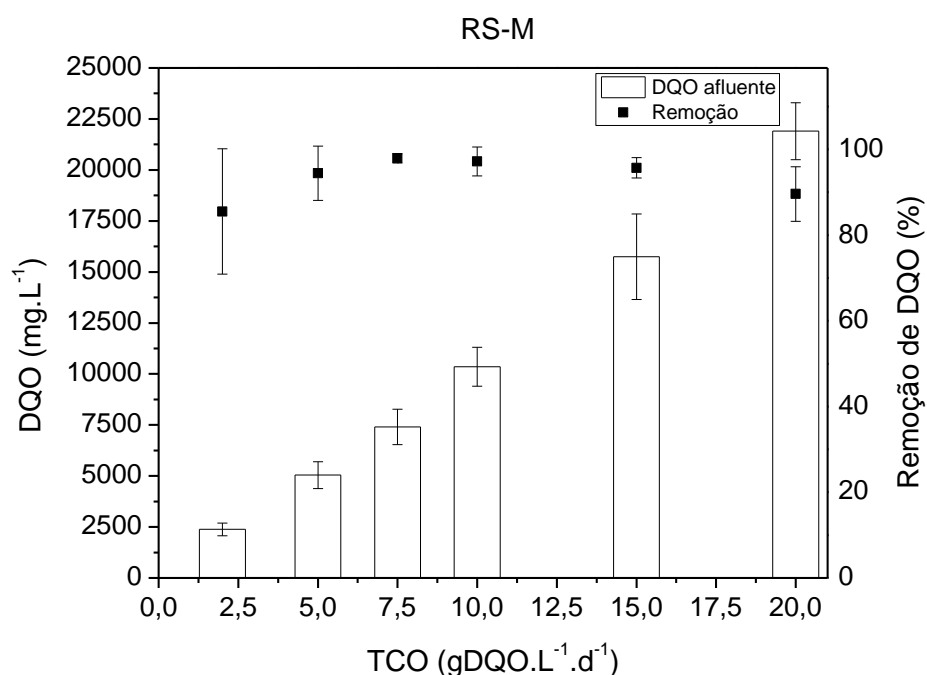
**Figura 27** - DQO inicial e remoção de DQO no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Apesar da TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ter promovido o maior consumo de DQO, 95,3%, verifica-se que todas as condições impostas permitiram um bom desempenho com relação a remoção da matéria orgânica, exibindo resultados próximos independente da taxa de carregamento aplicada.

No RS-M, o consumo de DQO oscilou entre 85,5% e 97,9%, conforme a Tabela 30 e Figura 28. A menor remoção de matéria orgânica ocorreu na TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> enquanto a maior foi referente a TCO de 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, exibindo neste intervalo crescimentos contínuos a medida que maiores cargas orgânicas foram aplicadas. No entanto, ao aumentar a TCO de 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> comportamento contrário foi observado, no qual verificou-se um decréscimo na remoção da DQO de 97,9% para 89,6%. Observa-se que no processo em dois estágios as remoções de DQO nos reatores metanogênicos foram próximas nas duas temperaturas estudadas.

**Tabela 30** – DQO afluente e remoção de DQO no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Reator metanogênico sequencial mesofílico – RS-M			
Fase	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Concentração afluente (mgDQO.L <sup>-1</sup> )	Remoção de DQO (%)
1	2	2.378,9 ± 314,2	85,5
2	5	5.043,4 ± 659,2	94,4
3	7,5	7.400,8 ± 868,9	97,9
4	10	10.351,2 ± 955,7	97,2
5	15	15.747,6 ± 2.096,4	95,7
6	20	21.899,6 ± 1.398,5	89,6



**Figura 28** - DQO inicial e remoção de DQO no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Como visto nas Figuras 19 e 20, o aumento na TCO permitiu que maiores remoções de matéria orgânica fossem observadas no RS-T e no RS-M, atingindo valores máximos em 10 e 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente, e conseqüentemente, acima dessas taxas de carregamento ocorreu um decréscimo no consumo de DQO. Tangkathitipong et al. (2017) atestaram comportamento similar avaliando a co-digestão de água residuária de biodiesel com glicerina utilizando TCO entre 5,6 e 14 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os autores verificaram acréscimos na remoção de DQO até 63,2% quando 11,3 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi aplicado no reator, sendo que, acima dessa TCO, menores remoções foram observadas.



Assim como nos reatores metanogênicos sequenciais deste trabalho, Ferraz Júnior et al. (2016) estudando a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em dois estágios constataram um aumento no consumo de DQO em decorrência de acréscimos na TCO. Dessa maneira, variando a TCO de 15 para 25 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, os autores observaram no reator metanogênico um incremento de 38,8% para 63% na remoção de DQO. Diferente do que ocorreu no RS-T e no RS-M, a aplicação de maiores taxas de carregamento no reator não colaborou para aumentos na produção de ácidos e solventes, sendo verificado um decaimento de 9,36 para 5,93 gDQO.L<sup>-1</sup> na produção desses metabólitos em decorrência do aumento da TCO. Empregando vinhaça de cana-de-açúcar para avaliar a digestão anaeróbia em dois estágios em reator RALF, Ramos e Silva (2020) também verificaram um aumento na remoção de DQO de 59,2% para 69,4% quando a TCO variou de 12 para 21,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Ao analisar o consumo de matéria orgânica em processos de digestão anaeróbia, a composição do substrato a ser degradado deve ser considerada na avaliação. Dareioti e Kornaros (2015) investigando a co-digestão de sorgo ensilado, estrume de vaca e soro de queijo em processo dois estágios utilizando CSTR mesofílico constataram que o aumento da TCO de 3,58 para 7,15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi prejudicial para remoção de DQO, promovendo uma queda no consumo de 84,77% para 39,29%. À medida que maiores cargas orgânicas foram sendo adicionadas ao reator observou-se aumentos de 0,30 para 19,51 g.L<sup>-1</sup> na concentração de ácidos voláteis. Por conter um material lignocelulósico em sua composição, a co-digestão avaliada pelos autores teve seu melhor desempenho na TCO mais baixa, 3,58 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a qual utilizou o maior TDH de 24 d.

De maneira geral, os elevados resultados de eficiência de remoção de matéria orgânica do RS-T e RS-M estão de acordo com reportado em processos dois estágios para soro de queijo na literatura, no qual remoções acima de 90% foram verificadas (ANTONOPOULOU et al., 2008; VENETSANEAS et al., 2009; COTA-NAVARRO et al., 2011; ASUNIS et al., 2020; LOVATO et al., 2020).

Dentre os reatores metanogênicos estudados nesta pesquisa, conclui-se que os reatores metanogênicos de segundo estágio, alimentados com o efluente do reator acidogênico, foram mais eficientes na degradação de matéria orgânica em comparação com reator metanogênico de estágio único, apresentando remoções 8,7% e 10,8% maiores em pontos percentuais no RS-T e RS-M na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, condição com maior consumo de DQO do RU-T. Incrementos na remoção de DQO ao empregar um processo em dois estágios também foram confirmados por Meng et al. (2017). Os autores estudaram a digestão de melaço em reator de leito fixo variando a concentração entre 20 e 90 gDQO.L<sup>-1</sup>. Dessa maneira, o reator em fase

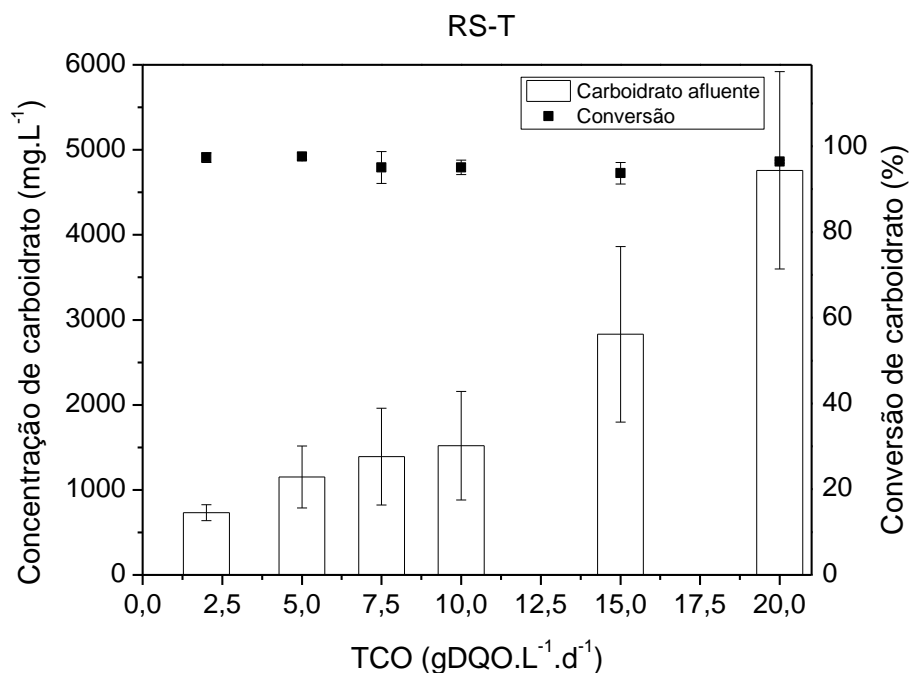
única promoveu uma remoção de 80% de DQO enquanto o uso de dois estágios alcançou remoção de 90% da matéria orgânica. Fu et al. (2017) investigando a digestão anaeróbia de vinhaça em reator batelada atestaram maiores eficiências de remoção de DQO solúvel em processos de dois estágios do que em estágio único, verificando consumos de 83,3% e 79,6%, respectivamente.

Ao analisar os três reatores metanogênicos, RU-T, RS-T e RS-M, presume-se que os menores consumos de DQO obtidos no reator de estágio único podem ser associados ao fato do afluente desse reator estar na sua forma bruta, sendo constituído por compostos mais complexos, enquanto os afluentes dos reatores metanogênicos sequenciais já foram convertidos a compostos mais simples devido às etapas de hidrólise e acidogênese realizadas no reator acidogênico. Conforme apresentado anteriormente, este resultado está de acordo com resultados encontrados na literatura, cujos processos em dois estágios são mais eficientes na remoção da carga orgânica (SRISOWMEYA; CHAKRAVARTHY; NANDHINI DEVI, 2020).

Com relação aos consumos de carboidratos totais do RS-T, exibidos na Tabela 31 e Figura 29, verifica-se que a concentração inicial variou de 723,9 mg.L<sup>-1</sup> a 4.759,1 mg.L<sup>-1</sup>, e que conversões entre 93,7% e 97,6% foram atribuídas ao reator. Em todas as fases o RS-T apresentou elevada conversão de carboidratos, acima de 90%. No entanto, observa-se que o maior consumo ocorreu na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto a menor conversão foi na TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

**Tabela 31** – Concentração afluente e conversão de carboidratos do RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

<b>Reator metanogênico sequencial termofílico – RS-T</b>			
<b>Fase</b>	<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração afluente de carboidrato (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conversão de carboidrato (%)</b>
<b>1</b>	2	732,9 ± 93,4	97,4
<b>2</b>	5	1.153,5 ± 364,1	97,6
<b>3</b>	7,5	1.390,9 ± 568,3	95,0
<b>4</b>	10	1.519,9 ± 637,9	95,1
<b>5</b>	15	2.830,9 ± 1.033,1	93,7
<b>6</b>	20	4.759,1 ± 1.159,4	96,4

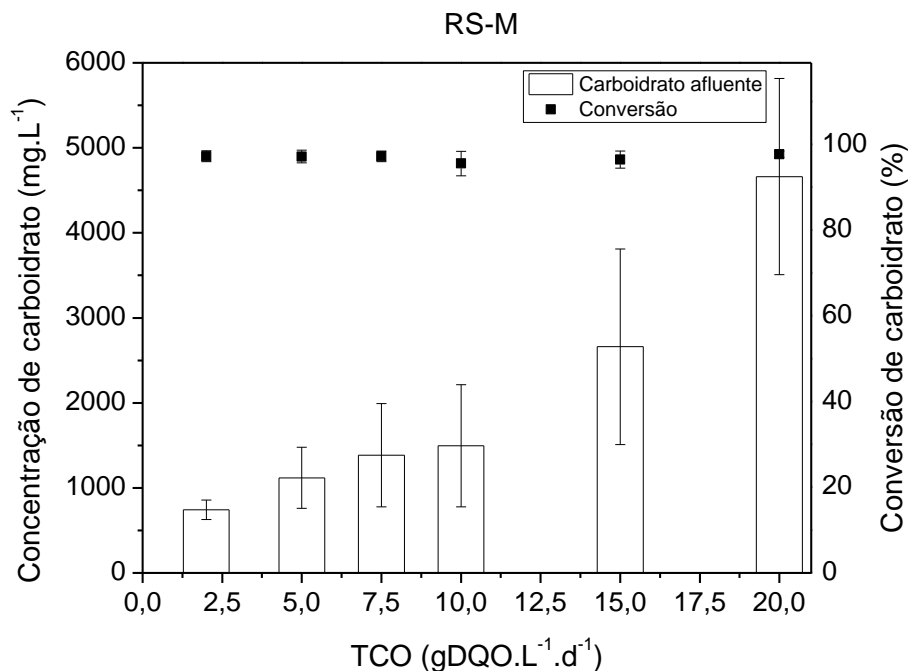


**Figura 29** - Concentração inicial de carboidratos totais e remoção de carboidrato no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

O reator sequencial mesofílico também apresentou alta conversão dos carboidratos totais alimentados ao reator, conforme exibido na Tabela 32 e Figura 30. Remoções acima de 95% foram obtidas em todas as condições ao qual o RS-M foi submetido. As concentrações afluentes aplicadas permaneceram na faixa entre 743,7 mg.L<sup>-1</sup> e 4.660,7 mg.L<sup>-1</sup>, e, assim como aconteceu no RS-T, os maiores consumos de carboidrato ocorreram nas TCO de 2, 5 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, apresentando também consumo de 97,2% na TCO de 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

**Tabela 32** – Concentração afluente e conversão de carboidratos no RS-M nas TCO 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Reator metanogênico sequencial mesofílico – RS-M			
Fase	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Concentração afluente de carboidrato (mg.L <sup>-1</sup> )	Conversão de carboidrato (%)
1	2	743,7 ± 114,4	97,2
2	5	1.118,6 ± 358,5	97,1
3	7,5	1.384,4 ± 606,8	97,2
4	10	1.495,9 ± 717,3	95,5
5	15	2.661,0 ± 1.150,1	96,4
6	20	4.660,7 ± 1.153,7	97,6



**Figura 30** - Concentração inicial de carboidratos totais e conversão de carboidrato no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Na literatura também se observa elevadas conversões de carboidratos em processos dois estágios. Utilizando vinhaça de cana-de-açúcar, Ferraz Júnior (2013) verificaram a produção de metano em estágio único e a partir de efluente acidificado de reator acidogênico (processo sequencial), ambos em reator UASB em temperatura de 55°C. TCO de 20 e 25 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram aplicadas e, tanto para o processo de fase única como para o realizado em duas fases, a conversão de carboidrato foi superior a 98,5% nas duas TCO estudadas. Assim como ocorreu no trabalho de Ferraz Júnior (2013), neste trabalho também foram observadas elevadas conversões de carboidrato (acima de 90%) em condição semelhante de temperatura e nas duas configurações estudadas, operação em fase única e sequencial.

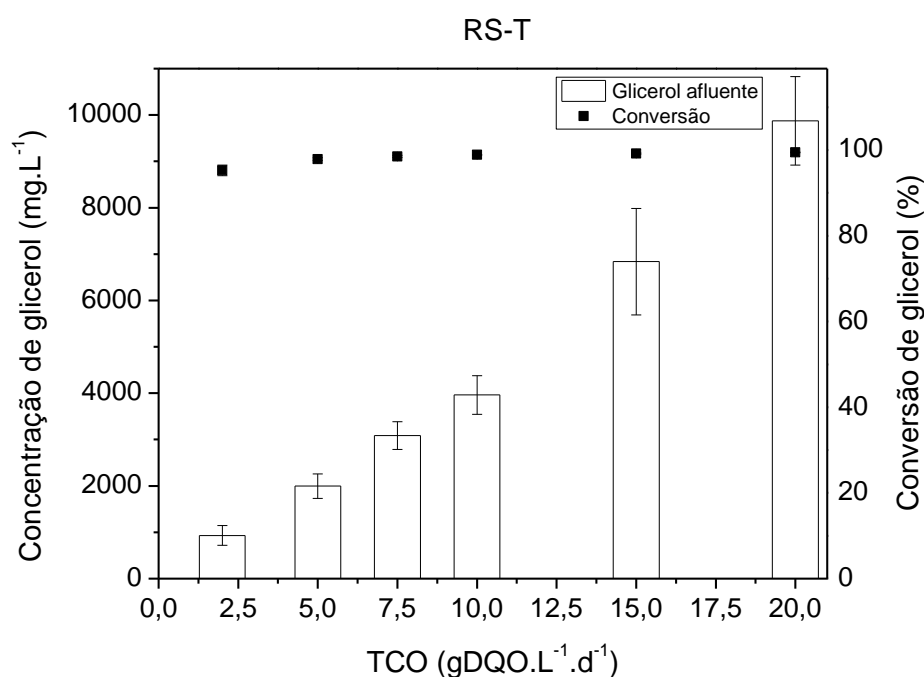
A influência do TDH no processo em dois estágios foi avaliada por Dareioti e Kornaros (2015) utilizando efluente de laticínio. No reator acidogênico, 34% dos carboidratos totais foram consumidos em todos os TDH estudados, 0,5 a 5 d, sugerindo que o consumo de carboidrato não foi afetado pela variação do TDH. No reator metanogênico a degradação de carboidratos totais foi de 90,22% no TDH de 16 h e de 86,19% no TDH de 12 h em equivalência de glicose. Verifica-se que os resultados obtidos pelos autores foram semelhantes aos alcançados neste trabalho, no qual o reator acidogênico RA-T exibiu baixo consumo de carboidratos, 41,0% – 51,2%, porém elevadas conversões foram possíveis nos reatores metanogênicos sequenciais.

Por ser tratar de compostos menos complexos, o emprego da operação em fase única ou em duas fases não interferiu na conversão de carboidratos, sendo apresentado elevadas conversões nos três reatores metanogênicos.

As concentrações iniciais de glicerol no RS-T variaram de  $930,3 \pm 211,7 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $9.871,6 \pm 955,0 \text{ mg.L}^{-1}$  e conversões de glicerol entre 95,3% e 99,5% foram observadas, conforme apontado na Tabela 33 e Figura 31.

**Tabela 33** – Concentração afluente e conversão de glicerol no RS-T nas TCO de 2 a 20  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e TDH de 24 h

Reator metanogênico sequencial termofílico – RS-T			
Fase	TCO ( $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )	Concentração afluente de glicerol ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Conversão de glicerol (%)
1	2	$930,3 \pm 211,7$	95,3
2	5	$1.996,1 \pm 264,6$	97,9
3	7,5	$3.087,0 \pm 298,6$	98,5
4	10	$3.962,0 \pm 417,3$	98,9
5	15	$6.836,8 \pm 1.150,0$	99,2
6	20	$9.871,6 \pm 955,0$	99,5



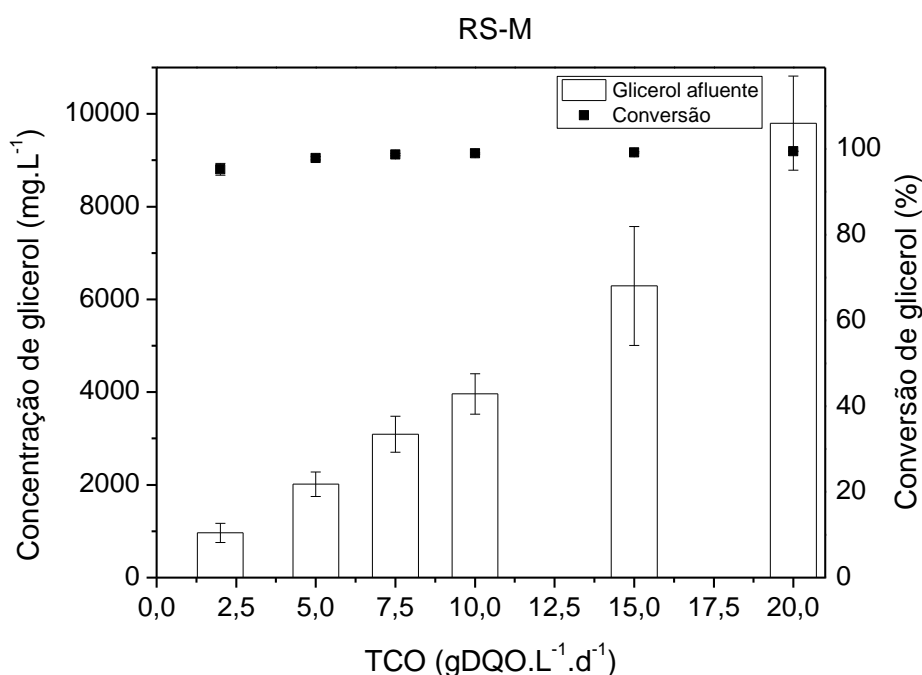
**Figura 31** - Concentração inicial e conversão de glicerol no RS-T nas TCO de 2 a 20  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e TDH de 24 h

O reator metanogênico sequencial mesofílico (RS-M) comportou-se de forma similar ao termofílico com relação à conversão de glicerol (Figura 32), apresentando consumos médio

entre 95,3% e 99,5% e concentrações iniciais entre  $964,9 \pm 206,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $9.799,7 \pm 1.016,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Analisando a Tabela 34, observa-se que o menor consumo de glicerol ocorreu na TCO de  $2 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  enquanto o maior consumo foi na TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ .

**Tabela 34** – Concentração afluyente e conversão de glicerol no RS-M nas TCO de 2 a 20  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e TDH de 24 h

Reator metanogênico sequencial mesofílico – RS-M			
Fase	TCO ( $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )	Concentração afluyente de glicerol ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Conversão de glicerol (%)
1	2	$964,9 \pm 206,2$	95,3
2	5	$2.014,1 \pm 262,5$	97,8
3	7,5	$3.091,6 \pm 386,6$	98,7
4	10	$3.960,6 \pm 438,1$	99,0
5	15	$6.289,9 \pm 1.280,2$	99,2
6	20	$9.799,7 \pm 1.016,5$	99,5



**Figura 32** – Concentração inicial e conversão de glicerol no RS-M nas TCO de 2 a 20  $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e TDH de 24 h

Tanto o processo sequencial termofílico quanto o mesofílico possibilitaram elevados consumo de glicerol, com valores superiores a 95%, indicando que a diferença entre as temperaturas empregadas não interferiu na atividade dos microrganismos com relação a sua utilização. Neste mesmo sentido, a adoção de um processo em dois estágios ou em estágio

único também não afetou o uso deste co-substrato, sendo observado nos três reatores metanogênicos, RU-T, RS-T e RS-M, consumos de glicerol maiores do que 95%.

#### 4.3.1. Rendimento e produção volumétrica de metano no RS-T e RS-M

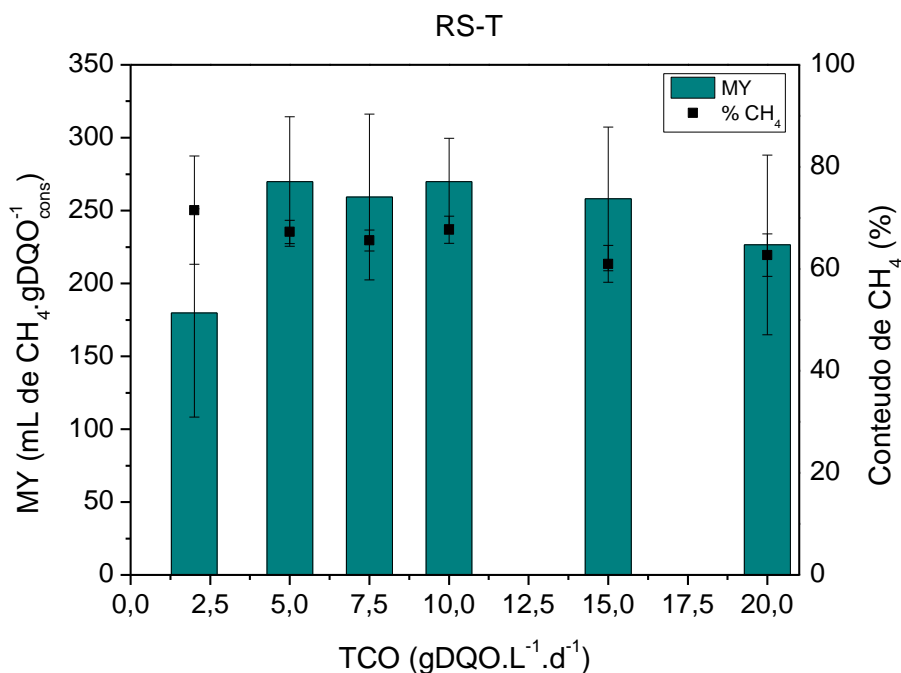
O rendimento de metano juntamente com a composição do biogás determinados nas diferentes TCO aplicadas no RS-T estão expostos na Tabela 35 e Figura 33. O aumento na TCO de 2 para 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no RS-T possibilitou um incremento de 50,2% no rendimento, atingindo máximo valor de 269,9 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub> neste reator. Contudo, com contínuo acréscimo na TCO até 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o rendimento diminuiu cerca de 16,1%, permanecendo em 226,4 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>cons</sub>.

Com relação à porcentagem de metano presente no biogás, verificou-se um comportamento contrário ao observado para o rendimento. Assim, ao aumentar a TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a parcela de CH<sub>4</sub> no biogás diminuiu de 71,5% para 62,7%. Este resultado se mostra semelhante ao resultado apresentado no reator metanogênico termofílico (RU-T). Assim como neste trabalho, Costa (2017) observou em seu estudo sobre a digestão anaeróbia de glicerol em reator RALF um decréscimo de 86,2% para 57% de metano na composição do biogás em decorrência do aumento da concentração de substrato de 1 gDQO.L<sup>-1</sup> para 7 gDQO.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 35** – Rendimento de metano e composição do biogás produzido no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Fase	TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	MY (mL de CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> <sub>cons</sub> )	%CH <sub>4</sub> no biogás (%)
1		2	179,7 ± 71,5	71,5 ± 10,6
2		5	269,9 ± 44,4	67,2 ± 2,3
3	24	7,5	259,3 ± 56,9	65,6 ± 2,0
4		10	269,9 ± 29,7	67,7 ± 2,7
5		15	258,0 ± 49,3	61,0 ± 3,6
6		20	226,4 ± 61,7	62,7 ± 4,2

MY: rendimento de metano



**Figura 33** – Rendimento de metano e conteúdo de CH<sub>4</sub> no biogás produzido no RS-T nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

A queda do rendimento de metano no RS-T com a aplicação de elevadas TCO pode ser relacionada ao acúmulo de AOV no reator, que passou de um intervalo de 81 – 97 mgHAc.L<sup>-1</sup> para 129 – 619 mgHAc.L<sup>-1</sup> com o aumento na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. O acúmulo demasiado de AOV pode afetar a atividade dos microrganismos metanogênicos e levar a falhas no processo (SRISOWMEYA; CHAKRAVARTHY; NANDHINI DEVI, 2020). Dareioti e Kornaros (2015) verificaram queda de 223,09 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> para rendimento aproximadamente nulo simultaneamente ao aumento na concentração total de AOV de 0,3 para 19,5 g.L<sup>-1</sup>. Assim como ocorreu no RS-T, no estudo de Dareioti e Kornaros (2015) o aumento no acúmulo de AOV no reator CSTR de segundo estágio se deu por acréscimos na TCO de 3,58 para 7,15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Dounavis et al. (2016) também apontaram decréscimos no rendimento de 0,29 para 0,25 L CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> com o aumento na TCO de 0,5 para 1,25 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ao estudarem a digestão anaeróbia de resíduo de glicerol em processo dois estágios aplicando reator CSTR. Os autores atribuíram o decréscimo no rendimento a inibições cinéticas. Tangkathitipong et al. (2017) avaliaram a aplicação do processo em dois estágios na co-digestão de água residuária de biodiesel e glicerina e, assim como neste estudo, observaram com o aumento na TCO de 5,6 para 11,3 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> um incremento no rendimento até 128,4 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. Posteriormente, com o acréscimo na TCO para 14,1 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, os autores verificaram máximo acúmulo de



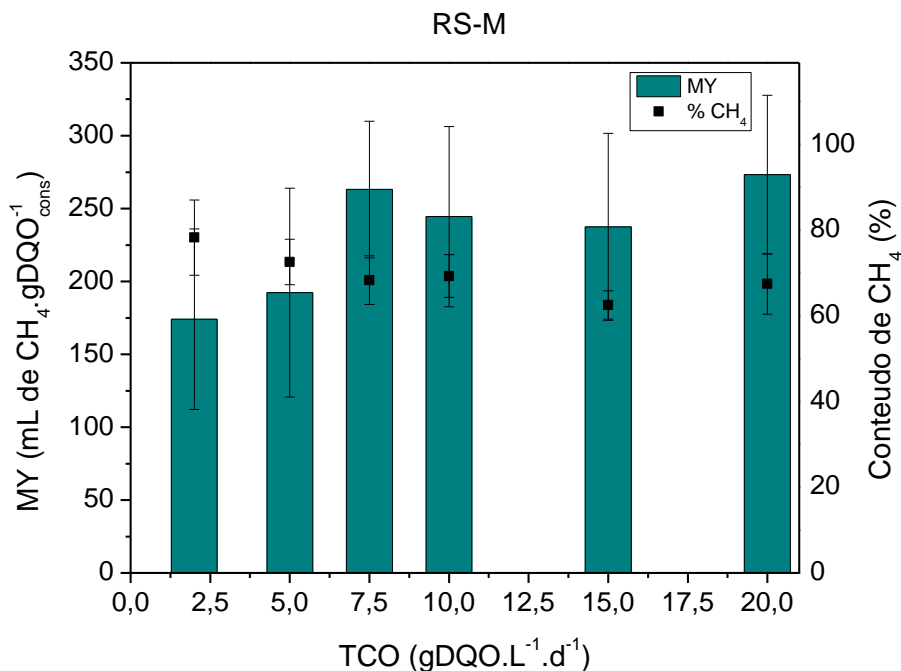
AOV, igual a  $980 \text{ mgHAc.L}^{-1}$ , e um decaimento na remoção de matéria orgânica acompanhado por decréscimo no rendimento para aproximadamente  $80 \text{ mL CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ .

No RS-M, o aumento da TCO de  $2 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  decorrente de acréscimos na concentração dos substratos, também permitiu que maiores rendimentos de metano fossem obtidos. No entanto, o comportamento exibido neste reator foi diferente do apresentado nos reatores termofílicos. O rendimento de  $\text{CH}_4$  foi favorecido por incrementos na TCO até que esta atingisse  $7,5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Dessa maneira, observou-se aumento de  $174,1 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$  para  $263,1 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ , fornecendo acréscimo de  $51,1\%$ . Posteriormente, análogo ao que aconteceu no RU-T e RS-T, o aumento da TCO promoveu uma ineficiência no rendimento de metano, resultando em decréscimos de aproximadamente  $10\%$ , produzindo assim  $237,4 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ . No entanto, ao atingir a TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , foi observado  $273,2 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ , sendo este o maior rendimento verificado na operação. Na Tabela 36 e Figura 34 podem ser encontrados os valores de rendimento e conteúdo de metano para cada fase aplicada neste reator.

**Tabela 36** – Rendimento de metano e composição do biogás produzido no RS-M nas TCO de 2 a  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e TDH de 24 h

Fase	TDH (h)	TCO ( $\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )	MY ( $\text{mL de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}_{\text{cons}}$ )	% $\text{CH}_4$ no biogás (%)
1		2	$174,1 \pm 61,9$	$78,2 \pm 8,8$
2		5	$192,3 \pm 71,7$	$72,5 \pm 5,3$
3	24	7,5	$263,1 \pm 46,9$	$68,3 \pm 5,7$
4		10	$244,4 \pm 61,9$	$69,3 \pm 5,0$
5		15	$237,4 \pm 64,1$	$62,5 \pm 3,3$
6		20	$273,2 \pm 54,4$	$67,4 \pm 7,0$

MY: rendimento de metano



**Figura 34** – Rendimento de metano e conteúdo de CH<sub>4</sub> no biogás produzido no RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

A respeito da composição do biogás, semelhante ao que ocorreu no RS-T, a porcentagem de metano foi inversamente proporcional à TCO aplicada, ou seja, ao aumentar a TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, foram observados decréscimos de 78,2% para 67,4% de CH<sub>4</sub> no biogás. Ramos et al. (2021) verificaram %CH<sub>4</sub> entre 86 – 56% utilizando reator RALF termofílico no segundo estágio do processo em dois estágios e entre 84 – 66% ao aplicar RALF mesofílico. Assim como ocorreu neste estudo, os autores observaram maiores %CH<sub>4</sub> em condição mesofílica do que em termofílica ao utilizar elevadas TCO (13,3 – 24,7 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Antonoupolou et al. (2008) realizaram a digestão anaeróbia de soro de queijo em dois estágios sob condição mesofílica e verificaram %CH<sub>4</sub> entre 71,4% e 74,9%.

Ao comparar os resultados obtidos nos reatores metanogênicos sequenciais, verificase que os dois reatores apresentaram comportamento parecido, e valores de rendimento e conteúdo de metano similares até atingir a TCO de 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, com exceção apenas do rendimento de metano na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, fase 2 do reator mesofílico. O rendimento obtido na fase 2 do RS-M pode ser explicado ao analisar a produção de ácidos orgânicos nesta fase para o reator. Concentração de até 544 mg.L<sup>-1</sup> esteve presente no efluente do RS-M, indicando maior acúmulo de ácidos em relação ao observado no RS-T sob a mesma condição, o qual apresentou concentração máxima de 244 mg.L<sup>-1</sup>. Portanto, apesar do reator ter alcançado consumos de DQO, carboidrato e glicerol superiores a 90%, o substrato foi convertido a

metabólitos ácidos que acumularam no reator e resultaram em rendimento de  $\text{CH}_4$  aproximadamente 28,8% inferior ao apresentado no RS-T na fase 2.

Todavia, nas TCO de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , o RS-T apresentou rendimentos de metano 10,4% e 8,6% maiores do que os observados no RS-M. Quando a TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  foi imposta nos reatores, observou-se que o reator metanogênico mesofílico proporcionou os melhores resultados de rendimento, sendo este aproximadamente 20,7% maior do que o rendimento do RS-T. Dessa forma, verifica-se que em concentrações e TCO baixas ( $2$  a  $7,5 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) a temperatura não teve muita influencia sob o rendimento de  $\text{CH}_4$ . Já sob concentrações e TCO moderadas ( $10$  e  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) o reator termofílico sobressaiu o reator mesofílico. De fato, temperaturas na faixa termofílica apresentam velocidades de reação mais elevadas e maior produção de metano do que na faixa mesofílica, apesar do processo mesofílico exibir maior estabilidade a variações operacionais (COSTA et al., 2021). Entretanto, ao utilizar concentrações e TCO mais altas ( $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) a temperatura na faixa mesofílica foi melhor. Sabe-se que em temperaturas mais altas é possível que haja uma seletividade dos microrganismos e em temperaturas mais amenas uma maior diversidade microbiana (CREMONEZ et al., 2021). Tal diversidade em sistemas mais complexos, com maior carga orgânica, seria mais razoável para degradação dos substratos e produção de biogás (RAMOS, 2016), enquanto a seletividade dos processos termofílicos pode acabar limitando a produção de metano caso a comunidade específica selecionada não esteja adaptada (RAMOS et al., 2021). Ramos et al. (2021) avaliaram o efeito da temperatura no reator RALF de segundo estágio na digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar aplicando TCO de  $18$  e  $24 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e identificaram melhor desempenho do reator termofílico na TCO de  $18 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  produzindo rendimento de  $0,17 \text{ L CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ . Porém na TCO mais elevada ( $24 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), assim como neste estudo, o reator mesofílico apresentou rendimento 60% maior do que o termofílico.

Avaliando os melhores resultados obtidos pelos reatores RS-T e RS-M,  $269,9$  e  $273,2 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}$ , verifica-se rendimentos similares, sendo estes aproximadamente 77% e 78% do valor teórico,  $350 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}$ . Em termos estatísticos, realizando um teste de Fischer com nível de significância  $0,05$ , verifica-se que as médias não diferem estatisticamente. Dounavis et al. (2016) utilizando processo de digestão anaeróbia em dois estágios para tratar resíduo de glicerol (92,2% de pureza) determinaram resultado próximo ao exibido nesta pesquisa, gerando 73% do rendimento teórico, ou seja,  $256 \text{ mL de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ . Rendimento similar ao apresentado no RS-M também foi observado no trabalho de Ramos e Silva (2020), produzindo  $0,26 \text{ L de CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$  num processo em dois estágios sob TCO de

21,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os autores utilizaram reator RALF para estudar a digestão anaeróbia da vinhaça de cana de açúcar e aplicaram TDH de 10 h. Fuess et al. (2017) estudando a aplicação da vinhaça de cana de açúcar em processo com separação de fase obtiveram 283 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>rem</sub> utilizando reator UASB no segundo estágio, e 301 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>rem</sub> com reator anaeróbio de leito estruturado (ASTBR). Condição termofílica (55°C) e taxa de carregamento de 25 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram adotadas.

Na Tabela 37 são apresentados alguns trabalhos da literatura que aplicaram processo em dois estágios utilizando soro de queijo ou glicerol como substratos e co-substratos para comparação com os resultados fornecidos no RS-T e RS-M.

**Tabela 37** - Trabalhos de digestão anaeróbia em processo dois estágios que utilizaram soro de queijo, água residuária de laticínios e glicerol como substrato e co-substrato

Substrato	Temperatura (°C)	Reator	Rendimento de H <sub>2</sub>	Rendimento de CH <sub>4</sub> (mL CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> <sub>cons</sub> )	Autor
Soro de queijo	25-30	CSTR/UASB	2,82 mol de H <sub>2</sub> .mol de lactose <sup>-1</sup>	250	(COTA-NAVARRO et al., 2011)
Água residuária de laticínio	60/40	IBR/IBR	160,7 ml de H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	178,1	(ZHONG; STEVENS; HANSEN, 2015)
Sorgo ensilado, soro de queijo e estrume de vaca	37/37	CSTR/CSTR	0,70 mol de H <sub>2</sub> .mol de carboidrato <sup>-1</sup>	223,09	(DAREIOTI; KORNAROS, 2015)
Soro de queijo	35/55	SBR/SBR	7,3 – 12 mL de H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	340,4 <sup>a</sup>	(FERNÁNDEZ et al., 2015)
Soro de queijo	37/37	CSTR/CSTR	-	180,35 <sup>a</sup>	(DAREIOTI et al., 2021)
Lodo de esgoto e glicerol bruto	-	CSTR/CSTR	26 mL de H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	290	(RIVERO; SOLERA; PEREZ, 2014)
Glicerol	35/35	PBR/CSTR	0,52 mol de H <sub>2</sub> .mol glicerol <sup>-1</sup>	290	(DOUNAVIS et al., 2016)
Água residuária de biodiesel e glicerol	37/37	ASBR/ASBR	4,93 ml de H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	128,4	(TANGKATHITIPONG et al., 2017)
Soro de queijo e glicerol	30/30	AnSBBR/AnSBBR	5,4 mmol de H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	369,7	(LOVATO et al., 2020)
Soro de queijo e glicerol	55/55	RALF/RALF	1,0 mmol de H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	269,9	Este estudo
Soro de queijo e glicerol	55/22	RALF/RALF	0,8 mmol de H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	273,2	Este estudo

CSTR: reator contínuo de mistura perfeita; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; IBR: reator de leite induzido; SBR: reator batelada sequencial; PBR: reator de leite fixo; ASBR: reator anaeróbio batelada sequencial; AnSBBR: reator anaeróbio de batelada sequencial com biomassa imobilizada; RALF: reator anaeróbio de leite fluidizado; <sup>a</sup>: mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>

Ao comparar o rendimento de metano produzido no RS-T e RS-M com os apontados na Tabela 37, verifica-se que o resultado observado neste trabalho se equipara aos exibidos por diferentes autores que utilizaram soro de queijo e/ou glicerol, os quais apresentaram rendimento no intervalo de 128,4 – 369,7 ml de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> (COTA-NAVARRO et al., 2011; RIVERO; SOLERA; PEREZ, 2014; DAREIOTI; KORNAROS, 2015; FERNÁNDEZ et al., 2015; ZHONG; STEVENS; HANSEN, 2015; DOUNAVIS et al., 2016; TANGKATHITIPONG et al., 2017; LOVATO et al., 2020). Lovato et al. (2020) estudaram a co-digestão de soro de queijo e glicerol em dois estágios aplicando reator AnSBBR mesofílico e observaram rendimento de metano superior ao verificado nesse estudo, igual a 16,5 mol CH<sub>4</sub>.kgDQO<sup>-1</sup>. Assim como ocorreu neste estudo, os autores verificaram acréscimos no rendimento à medida que maiores TCO foram impostas. No entanto, o melhor rendimento observado por Lovato et al. (2020) em condição mesofílica foi em 10,7 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto no RS-M a TCO cujo maior rendimento foi observado foi 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Considerando as produções de metano deste trabalho, observa-se que o processo em dois estágios utilizando reator metanogênico mesofílico aumentou em 75,7% o rendimento em relação ao processo em estágio único termofílico na mesma TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e em 8,0% em relação ao melhor resultado do RU-T, ou seja, TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. De acordo com Rajendran et al. (2020), incrementos no rendimento de 20 a 40% sobre o processo em estágio único são geralmente observados ao utilizar processo dois estágios. Separando a fase acidogênica da metanogênica no processo em dois estágios, pôde-se utilizar as condições mais adequadas para cada grupo microbiano que atua nessas duas etapas (CREMONEZ et al., 2021), como por exemplo, a adoção de pH mais ácido no reator acidogênico e pH mais básico no reator metanogênico. Outro parâmetro otimizado que pôde ser aplicado ao adotar a separação de fases foi o TDH, já que o reator acidogênico e metanogênico divergem quanto ao TDH ótimo. As bactérias fermentativas necessitam de um tempo menor do que as *archaeas* metanogênicas para realizar seu metabolismo e crescimento. Assim, separando as fases e aplicando TDH diferentes evita-se que a atividade das *archaeas* seja afetada por um possível acúmulo de ácidos produzidos pelas bactérias na etapa acidogênica. Tal fato fica mais evidente na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, na qual verifica-se acúmulo máximo de AOV no reator termofílico de fase única de até 1979 mgHAc.L<sup>-1</sup>, enquanto no reator metanogênico mesofílico do processo em dois estágios o acúmulo máximo de AOV foi 843 mgHAc.L<sup>-1</sup>, refletindo no rendimento superior de metano no RS-M.

Incrementos no rendimento de CH<sub>4</sub> também foram observados por Fernandez et al. (2015) ao estudar o processo em dois estágios utilizando soro de queijo em reator batelada

sequencial e aplicando TCO de 12,7 –25,3 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no reator acidogênico e 1,2 – 2,4 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no reator metanogênico sequencial. Similar ao que ocorreu no RM-S e no RU-T, o aumento foi de aproximadamente 8,2% em relação ao melhor resultado em estágio único. Ao contrário do que foi feito neste estudo, os autores utilizaram reator acidogênico mesofílico e metanogênico termofílico.

Fu et al. (2017) constataram aumento de 10,8% no rendimento de metano ao utilizar processo em dois estágios para digestão anaeróbia de vinhaça da produção de cerveja ou licor em condição mesofílica.

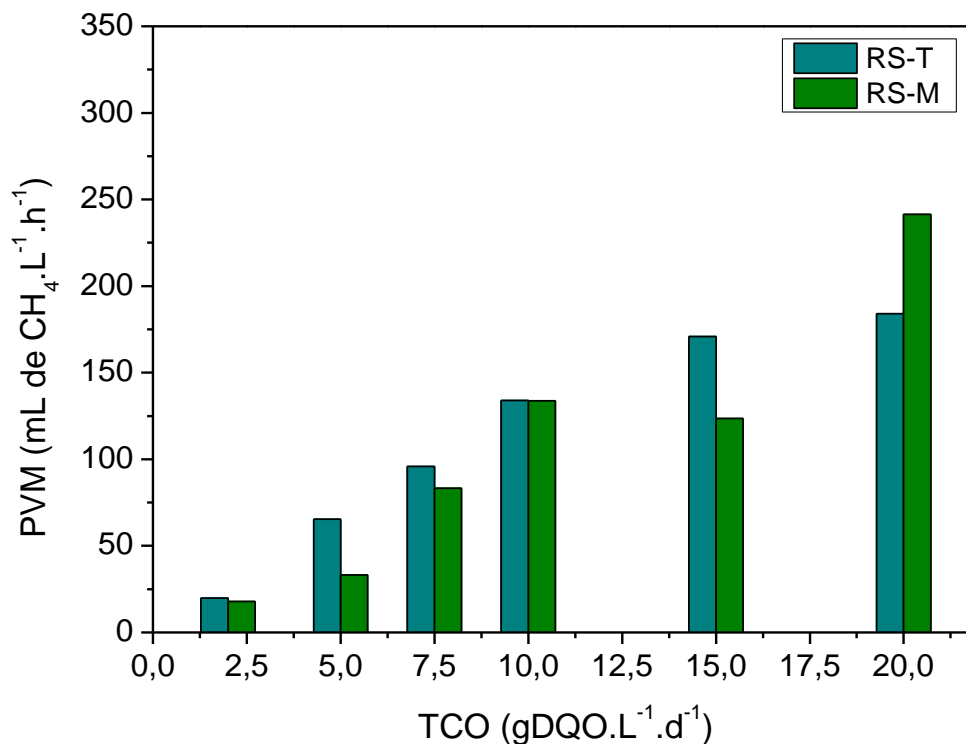
Utilizando glicerol como co-substrato, Rivero, Solera e Perez (2014) estudaram a operação em duas fases com uma mistura de lodo de esgoto e glicerol bruto e obtiveram rendimento de 290 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. Ressalta-se que TCO de 7,82 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi utilizada e, diferente da estratégia adotada neste estudo, todo o processo ocorreu na faixa mesofílica. Tangkathitipong et al. (2017) aplicando glicerina como co-substrato na co-digestão com água residuária de biodiesel apresentaram rendimento de 128,4 ml de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>. Os autores empregaram temperatura de 37°C e taxas de carregamento orgânico no intervalo 33,75-84,38 kg.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Zhong, Stevens e Hansen (2015) apresentaram rendimento de 178,1 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na digestão de resíduos de laticínios aplicando TCO de 3,7 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no reator metanogênico. Verifica-se que o rendimento de CH<sub>4</sub> visto no trabalho de Zhong, Stevens e Hansen (2015) foi menor do que o rendimento de 269,9 e 273,2 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> exibidos neste estudo. No entanto, a taxa de carregamento imposta no RS-M foi cerca de 5,4 vezes maior do que a utilizada pelos autores.

A produção volumétrica de metano (PVM) nos reatores metanogênicos sequenciais foi analisada e os valores correspondentes a cada reator nas diferentes fases estudadas são apresentados na Tabela 38 e Figura 35.

**Tabela 38** – Produção volumétrica de metano observada no RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Fase	TDH (h)	TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	PVM RS-T (mL de CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	PVM RS-M (mL de CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
1	24	2	19,9 ± 8,5	18,0 ± 7,7
2		5	65,4 ± 11,7	33,2 ± 14,4
3		7,5	95,8 ± 17,6	83,2 ± 13,4
4		10	134,0 ± 13,3	133,7 ± 31,3
5		15	170,8 ± 38,8	123,5 ± 48,0
6		20	184,0 ± 52,4	241,4 ± 49,7

PVM: produção volumétrica de metano



**Figura 35** - Produção volumétrica de metano obtida no RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Na menor TCO aplicada, 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, os reatores apresentaram PVM similares, com o maior valor fornecido pelo RS-T, 19,9 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, enquanto o RS-M exibiu produção volumétrica de 18,0 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Ao aumentar a TCO para 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o RS-T continuou a exibir vantagem sobre o RS-M, gerando 65,4 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, enquanto o RS-M produziu 33,2 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Observa-se que nesta condição, a produção volumétrica do reator sequencial termofílico foi aproximadamente 1,97 vezes superior à do reator sequencial mesofílico. Ao atingir a TCO de 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o RS-T produziu 95,8 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e o RS-M 83,2 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Nesta fase, verifica-se uma diferença menor entre os reatores, sendo a PVM do RS-T 17,5% maior do que a do RS-M. Observa-se o mesmo comportamento nas TCO de 10 e 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, com o reator termofílico apresentando maiores produções volumétricas, sendo estas 134,0 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 170,8 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e o mesofílico produzindo 133,7 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 123,5 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Entretanto, na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> o RS-T produziu 184,0 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, enquanto o RS-M produziu 241,4 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, sendo, portanto, a produção volumétrica do RS-M aproximadamente 31,2% superior a do RS-T. Diante deste



resultado, atesta-se mais uma vez que a temperatura na faixa mesofílica aplicada neste trabalho foi benéfica para os microrganismos em concentrações de substrato mais elevadas, assim como ocorreu com o rendimento de metano.

Como pode ser visto na Tabela 38, os reatores se comportaram de forma similar em função da variação na TCO de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, exibindo maiores produções volumétricas de CH<sub>4</sub> quanto mais elevada fosse a TCO imposta. Dessa maneira, a PVM máxima para ambos os reatores ocorreu na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, correspondendo a 184,0 e 241,4 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ou 4,4 e 5,8 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Tal fato pode ter ocorrido devido a maior disponibilidade de fontes de carbono para os microrganismos realizarem suas atividades metabólicas. Conforme apontado por Buitrón et al. (2014), o acréscimo na concentração de substratos favorece a produção sequencial, sendo observado pelos autores produções volumétricas de metano até 400% maior ao aplicar a digestão anaeróbia em dois estágios.

Ramos e Silva (2020) observaram produção volumétrica igual a 5,57 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no reator metanogênico de segundo estágio, sendo esta similar a obtida no RS-M. Assim como neste estudo, os autores também relataram aumentos na produção volumétrica de metano em decorrências da aplicação de maiores taxas de carregamento orgânico. Variando a TCO de 12 para 21,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, incremento de 51% foi verificado na PVM. Avaliando o aumento na produção de CH<sub>4</sub> no RS-M utilizando variação de TCO semelhante, de 10 para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, observa-se incremento de 37,3%.

Aplicando condição termofílica no reator acidogênico e mesofílica no reator sequencial, assim como foi feito neste trabalho, Algapani et al. (2019) observaram PVM de 2,9 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> na digestão anaeróbia de resíduo alimentar. Os autores utilizaram reator CSTR e TDH de 9 d no reator metanogênico. Observa-se que a PVM obtida por Algapani et al. (2019) foi inferior a fornecida no RS-M. Como discutido anteriormente, o reator RALF utilizado neste estudo pode ter colaborado para que maiores produções volumétricas de biogás fossem geradas devido ao seu grau de mistura. Além disso, a co-digestão pode ter proporcionado melhores condições para atuação dos microrganismos, como já demonstrado no trabalho de Astals et al. (2011), Lovato et al. (2016) e Rasit et al. (2019). Silva et al. (2018) atestou que a adição de glicerol como co-substrato na co-digestão de resíduo alimentar e lodo de esgoto colaborou para aumentos de 39,5% no rendimento de CH<sub>4</sub> e 46,3% na produção acumulativa de CH<sub>4</sub>.

As PVM determinadas na co-digestão de soro de queijo e glicerol em processo dois estágios avaliada neste estudo estão de acordo com os valores observados na literatura, na qual

verifica-se para operação em dois estágios com soro de queijo 5 L de  $\text{CH}_4\text{L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  (COTANAVARRO et al., 2011; ANTONOPOLOU et al., 2008), para co-digestão de resíduo sólido municipal e resíduo de glicerina PVM de 3,4 L de  $\text{CH}_4\text{L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  (ZAHEDI et al., 2017), e para co-digestão de torta de decantador de óleo de palma e glicerol bruto e co-digestão de água residuária de biodiesel e glicerina PVM de 0,7 L  $\text{CH}_4\text{L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017; TANGKATHITIPONG et al., 2017)

#### 4.3.2. Metabólitos solúveis dos reatores metanogênicos sequenciais – RS-T e RS-M

Os principais metabólitos produzidos nos reatores metanogênicos de segundo estágio foram HIsBu, com fração molar de 0,0 – 65,4% no RS-T e de 0,0 – 74,6% no RS-M, e HAc, com fração molar de 0,0 – 60,4% no RS-T e 0,0 – 80,1% no RS-M. As concentrações dos metabólitos identificados nos reatores encontram-se na Tabela 39.

No reator termofílico, o aumento na TCO de 2 para 20  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  promoveu acréscimo na concentração de HAc de  $30,0 \pm 27,9 \text{ mgHAc.L}^{-1}$  para  $313,9 \pm 36,8 \text{ mgHAc.L}^{-1}$ . A concentração de HIsBu também apresentou um aumento com a adição de TCO mais elevadas ao RS-T, sendo que em 2  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  não foi detectado HIsBu e com a elevação da TCO até 20  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  foi determinado  $207,6 \pm 7,6 \text{ mgHIsBu.L}^{-1}$ . Ainda foram identificados no reator termofílico ácido butírico ( $< 50 \text{ mgHBu.L}^{-1}$ ), ácido propiônico ( $< 30 \text{ mgHPr.L}^{-1}$ ) e furfural ( $< 25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) nas TCO de 15 e 20  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ , e ácido levulínico (HLe) na TCO de 10  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ .

No reator mesofílico foi observada menor variedade de metabólitos acumulados, não sendo estes detectados abaixo da TCO de 7,5  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ . Na TCO de 10  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  somente ácido isobutírico ( $29,9 \pm 16,9 \text{ mgHIsBu.L}^{-1}$ ) e ácido fórmico (HFo) ( $5,3 \pm 2,2 \text{ mgHFo.L}^{-1}$ ) foram identificados. Com o aumento na TCO de 15 para 20  $\text{gDQO.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  foi observado acréscimos na concentração de ácido acético ( $198,5 \pm 154,4 \text{ mgHAc.L}^{-1}$  para  $238,8 \pm 147,1 \text{ mgHAc.L}^{-1}$ ), ácido propiônico ( $50,2 \pm 32,0 \text{ mgHPr.L}^{-1}$  para  $71,1 \pm 4,2 \text{ mgHPr.L}^{-1}$ ), e ácido isobutírico ( $12,7 \pm 7,5 \text{ mgHIsBu.L}^{-1}$  para  $80,9 \pm 3,2 \text{ mgHIsBu.L}^{-1}$ ).

**Tabela 39** – Concentração dos metabólitos ácidos produzidos no RS-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

<b>Reator metanogênico sequencial termofílico – RS-T</b>						
<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>7,5</b>	<b>10,0</b>	<b>15,0</b>	<b>20,0</b>
HAc (mgHAc.L <sup>-1</sup> )	-	30,0 ± 27,9	-	28,8 ± 13,6	42,9 ± 11,4	313,9 ± 36,8
HPr (mgHPr.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	10,7 ± 2,0	26,4 ± 8,6
HIsBu (mgHIsBu.L <sup>-1</sup> )	-	37,2 ± 45,1	-	103,8 ± 42,0	145,6 ± 105,4	207,6 ± 7,6
HBu (mgHBu.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	10,7 ± 0,7	46,8 ± 25,1
HLe (mgHLe.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	16,6 ± 11,3	-	-
Furfural	-	-	-	-	23,2 ± 1,3	17,8 ± 2,5
<b>Reator metanogênico sequencial mesofílico – RS-M</b>						
<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>7,5</b>	<b>10,0</b>	<b>15,0</b>	<b>20,0</b>
HAc (mgHAc.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	198,5 ± 154,4	238,8 ± 147,1
HPr (mgHPr.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	50,2 ± 32,0	71,1 ± 4,2
HIsBu (mgHIsBu.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	29,9 ± 16,9	12,7 ± 7,5	80,9 ± 3,2
HFo (mgHFo.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	5,3 ± 2,2	-	-

HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HLe: ácido levulínico; HFo: ácido fórmico

Na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, verifica-se no reator mesofílico concentrações de ácidos mais baixas do que no reator termofílico, o que indicaria maior conversão dos metabólitos. No entanto, o rendimento no RS-T foi superior ao observado no RS-M. Porém, ao comparar os metabólitos e suas respectivas concentrações identificadas no RS-M com a quantidade de AOV determinado anteriormente (73-112 mgHAc.L<sup>-1</sup>), nota-se um resultado divergente. Por se tratar de concentrações baixas, o equipamento utilizado para identificar os metabólitos e quantidades acumuladas pode não ter detectado todos os metabólitos presentes no efluente. O balanço de DQO que será apresentado mais adiante, indica na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> maior porcentagem de DQO indiscriminada no RS-M (11,1%) do que no RS-T (1,6%). Lovato et al. (2020) aplicaram processo em dois estágios e também verificaram baixas concentrações de intermediários. Ao caracterizar os metabólitos dos efluentes, os autores observaram concentração nula para os metabólitos analisados (HAc, HPr, HBu, ácido valérico e etanol), com exceção de HAc na TCO de 3,6 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> que exibiu 0,2 mmolHAc.L<sup>-1</sup> e etanol em 10,7 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> que também apresentou 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>.

As concentrações de ácido propiônico determinadas nos reatores metanogênicos aplicando o processo em dois estágios encontram-se abaixo do limite de tolerância de 900 mgHPr.L<sup>-1</sup> indicado pela literatura (WANG et al., 2009) e foram inferiores às concentrações observadas no processo em estágio único, no qual foi verificado até

1147,3 mgHPr.L<sup>-1</sup>. O menor acúmulo de HPr no processo em dois estágios pode ser atribuído à separação de fases, uma vez que as bactérias degradadoras de propionato são inibidas sob elevadas pressões parciais de H<sub>2</sub> e concentrações de AOV (LI et al., 2012), e com a separação de fase têm-se a maior produção de H<sub>2</sub> e AOV no primeiro estágio (reator acidogênico) e menor concentração total de AOV acumulada no segundo estágio do que no processo em estágio único. Além disso, no processo em dois estágios, cada grupo de microrganismos (bactérias fermentativas e *archaeas* metanogênicas) podem atuar nas suas condições mais favoráveis (pH, TDH, temperatura), resultando em um melhor desempenho do processo. Ramos et al. (2020) também observaram menores concentrações de metabólitos ácidos na digestão anaeróbia de vinhaça com separação de fase, sendo verificada concentração máxima de 3221 mg.L<sup>-1</sup> em processo dois estágios, enquanto em processo de estágio único cerca de 6299 mg.L<sup>-1</sup> foram acumulados. Comparando a co-digestão de soro de queijo e glicerol em fase única avaliada em Lovato et al. (2016) com a realizada em dois estágios (LOVATO et al., 2020), verifica-se menor rendimento no processo em estágio único, que apresentou maior acúmulo de AOV (325 mgHAc.L<sup>-1</sup>), enquanto em Lovato et al. (2020) foi verificada concentração máxima de AOV de aproximadamente 200 mgHAc.L<sup>-1</sup>. Assim, na co-digestão de soro de queijo e glicerol avaliada neste estudo, os maiores rendimentos no processo em dois estágios do que no processo em estágio único (253 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>) podem ser atribuídos aos menores acúmulos de AOV obtidos com a separação de fase.

Na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, cujo maior rendimento de metano foi determinado no RS-M, é possível identificar uma considerável diferença na concentração de HAc entre os reatores, com menor acúmulo de HAc no reator mesofílico (238,8 mgHAc.L<sup>-1</sup>) do que no termofílico (313,9 mgHAc.L<sup>-1</sup>), o que pode explicar o maior rendimento do RS-M nesta TCO. Até a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, a concentração de HAc foi baixa nos dois reatores, sendo observada concentrações inferiores a 30 mgHAc.L<sup>-1</sup> no RS-T e não detecção no RS-M. Apesar das concentrações de HIsBu terem sido maiores no reator termofílico, verifica-se que o acúmulo desse intermediário não afetou o desempenho do reator, assim como a presença de demais metabólitos (furfural e HBu). De maneira geral, é possível identificar no reator termofílico maior variedade de metabólitos do que no reator mesofílico, podendo essa pluralidade de metabólitos ser associada a menor diversidade de microrganismos presentes em reatores termofílicos, e, portanto, menor capacidade de conversão de diferentes AOV.

### 4.3.3. Balanço de DQO no RS-T e RS-M

Com o aumento da TCO de 2 para 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, as concentrações de sólidos solúveis voláteis (SSV) no RS-T e no RS-M variaram de 31,5 ± 43,5 mg.L<sup>-1</sup> a 268,2 ± 169,2 mg.L<sup>-1</sup> e de 66,3 ± 21,9 mg.L<sup>-1</sup> a 177,8 ± 56,1 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Ao analisar o rendimento de metano no RS-M, identifica-se um acréscimo não esperado ao atingir a TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Esse acréscimo poderia ser associado ao processo de endogenia, o qual pode aumentar a liberação de metano por morte celular. No entanto, a quantidade de SSV no efluente do RS-M em 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (177,8 ± 56,1 mg.L<sup>-1</sup>) é menor do que na TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (222,6 ± 71,8 mg.L<sup>-1</sup>), indicando dessa forma menor lavagem de biomassa, e menor morte celular. Portanto, a hipótese de endogenia não se sustentaria. Além disso, ao comparar as concentrações de sólidos voláteis no efluente do RS-T e do RS-M observa-se o mesmo perfil de comportamento, e ainda se constata menores valores de SSV nesses reatores do que os determinados no reator de fase única, RU-T (83,00 - 309,75 mg.L<sup>-1</sup>).

Com relação ao balanço de DQO, atesta-se que o reator metanogênico sequencial termofílico apresentou diferenças percentuais entre a DQO efluente experimental (DQO<sub>Eex</sub>) e a DQO efluente calculada (DQO<sub>Eeq</sub>) entre 1,6 – 52,8%, enquanto no reator metanogênico mesofílico tais diferenças foram entre 11,1 – 58,9%, conforme apresentado na Tabela 40. No RS-T, as TCO de 5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foram as que apresentaram menor percentual de DQO indiscriminada, inferior a 5%, e as TCO de 2 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> as condições que forneceram maior discrepância (52,8% e 47,2%) entre o valor medido e o calculado com base nos componentes do efluente que foram identificados.

No RS-M, a maior desigualdade também ocorreu nas TCO de 2 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (51,2% e 58,9%), e as menores diferenças entre a DQO<sub>Eex</sub> e DQO<sub>Eeq</sub> foram exibidas nas TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (11,1%) e 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (14,5%). Nos reatores metanogênicos do processo em dois estágios elevadas diferenças percentuais podem ser observadas no balanço de DQO devido aos altos consumo de DQO que este tipo de processo proporciona. Assim, pequenas diferenças entre a DQO medida e a calculada, como por exemplo 132 mgDQO.L<sup>-1</sup> (DQO<sub>Eex</sub> – DQO<sub>Eeq</sub> = 52,8%), acabam representando uma elevada diferença percentual.

As diferenças apresentadas nos balanços de DQO ainda podem ser associadas a erros nas medidas e a não detecção de metabólitos pelo equipamento utilizado.

**Tabela 40** – Balanço de DQO no RS-T e RS-M

<b>Reator metanogênico sequencial termofílico – RS-T</b>						
<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>Carboidrato efluente (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	21,7	30,7	77,7	84,2	199,6	191,6
<b>Glicerol efluente (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	53,7	51,1	55,5	53,7	70,6	64,6
<b>SSV (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	42,3	64,5	108,2	95,8	240,9	360,1
<b>HAc (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	32,1	-	30,8	45,9	335,9
<b>HPr (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	16,1	39,8
<b>HLe (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	25,2	-	-
<b>HIsBu (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	67,7	-	189,0	265,0	377,8
<b>HBu (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	19,4	85,2
<b>Furfural (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	38,7	29,7
<b>DQO<sub>Ex</sub></b>	249,7	252,6	457,2	486,4	1248,7	2162,5
<b>DQO<sub>Eq</sub></b>	117,7	246,0	241,3	478,8	896,2	1484,8
<b>DQO<sub>Ex</sub> – DQO<sub>Eq</sub> (%)</b>	52,8	2,6	47,2	1,6	28,2	31,3
<b>Reator metanogênico sequencial mesofílico – RS-M</b>						
<b>Carboidrato efluente (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	23,3	36,0	43,8	75,3	106,2	123,2
<b>Glicerol efluente (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	55,7	52,9	48,9	50,4	61,0	63,5
<b>SSV (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	89,1	96,5	93,9	77,2	299,0	238,8
<b>HAc (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	212,4	255,6
<b>HPr (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	-	75,7	107,4
<b>HIsBu (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	54,5	23,2	147,2
<b>HFo (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	-	-	-	1,9	-	-
<b>DQO<sub>Ex</sub></b>	344,7	280,9	154,7	291,7	679,1	2276,7
<b>DQO<sub>Eq</sub></b>	168,1	185,4	186,6	259,2	777,6	935,7
<b>DQO<sub>Ex</sub> – DQO<sub>Eq</sub> (%)</b>	51,2	34,0	-20,6	11,1	-14,5	58,9

SSV: sólidos suspensos voláteis; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HLe: ácido levulínico; HFo: ácido fórmico

As DQO equivalentes (DQOeq) dos rendimentos de CH<sub>4</sub> e a parcela de DQO do afluente do reator que foi direcionada para o rendimento de CH<sub>4</sub> (%DQO<sub>CH<sub>4</sub></sub>) no RS-T e no RS-M estão apresentadas na Tabela 41. Conforme indicado na Tabela 41, no RS-T, a TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi a que proporcionou maior aproveitamento da DQO afluente para produção de CH<sub>4</sub>. No entanto, verifica-se valores similares entre 5 e 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, permanecendo com conversões de 67,9 à 73,4%. No reator mesofílico, o maior consumo de DQO para obtenção de metano ocorreu na TCO 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, sendo utilizada 73,6% da DQO afluente. Observa-se uso de 64,9 à 73,6% no intervalo 7,5 e 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Comparando esses resultados com o melhor resultado apontado no reator de fase única (63,4%), constata-se maior aproveitamento da DQO afluente nos reatores metanogênicos de dois estágios.

**Tabela 41** – DQO afluente convertida a CH<sub>4</sub> no RS-T e RS-M

<b>Reator metanogênico sequencial termofílico – RS-T</b>						
<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>DQOeq (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	1083,5	3829,8	5067,7	7587,2	10874,4	12476,2
<b>%DQO<sub>CH<sub>4</sub></sub></b>	45,9	73,3	69,4	73,4	67,9	58,1
<b>Reator metanogênico sequencial mesofílico – RS-M</b>						
<b>TCO (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>DQOeq (mgDQO.L<sup>-1</sup>)</b>	1011,3	2615,2	5443,9	7020,4	10215,0	15308,4
<b>%DQO<sub>CH<sub>4</sub></sub></b>	42,5	51,9	73,6	67,8	64,9	69,9

#### 4.3.4. Análise da comunidade microbiana do RS-T e RS-M

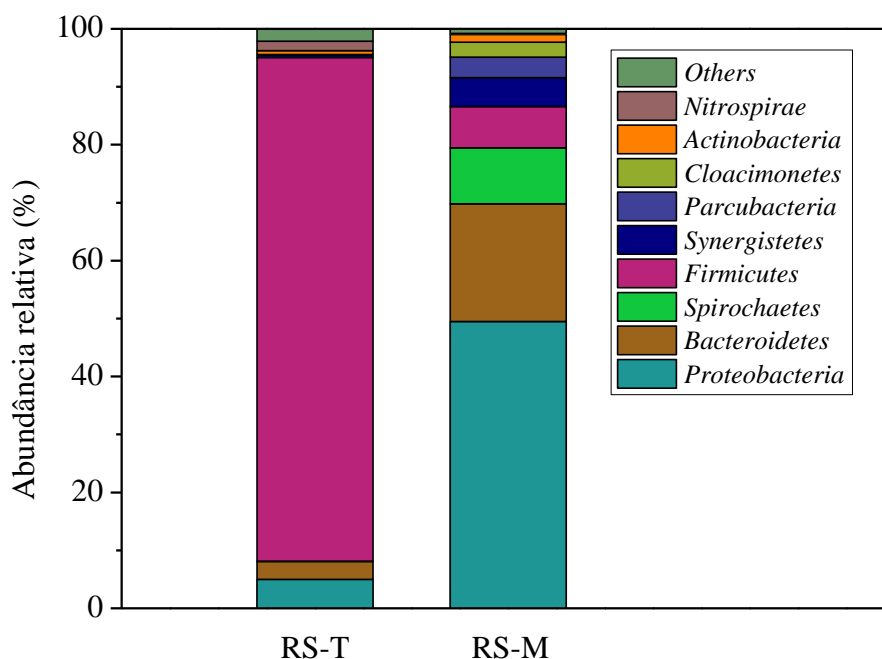
As análises de sequenciamento das amostras retiradas do reator metanogênico termofílico e do reator metanogênico mesofílico foram realizadas na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. No RS-T foi identificado 97,9% dos microrganismos como pertencentes ao domínio Bacteria e somente 2,1% ao domínio *Archaea*. Por outro lado, o RS-M exibiu domínio Bacteria correspondente a 73,2% dos microrganismos e o domínio *Archaea* a 26,8%. Dessa forma, devido à menor porção de microrganismos metanogênicos no RS-T, é possível verificar como as *archaeas* foram mais sensíveis à temperatura mais elevada. Entretanto, cabe ressaltar que foram utilizados lodos diferentes para inoculação do RS-T e RS-M, e que tal fato pode ter contribuído para a diferente distribuição na parcela de bactérias e *archaeas*. De toda forma, observa-se no reator mesofílico maior diversidade de microrganismos do que no reator termofílico. Assim, o Índice de Shannon e Índice de Simpson para domínio bactéria no reator mesofílico foi 4,7 e 0,9 e para o reator termofílico 3,4 e 0,7. Para o domínio *archaea* tais índices

foram iguais a 3,8 e 0,8 para reator mesofílico e 3,3 e 0,7 para o termofílico, confirmando a maior variedade de microrganismos no RS-M. Estes resultados estão de acordo com o apontado pela literatura que descreve os processos mesofílicos com maior diversidade microbiana e processos termofílicos com maior seletividade (CREMONEZ et al., 2021).

A distribuição dos filos com abundância relativa maior do que 1% no RS-T e RS-M é apresentada na Figura 36. Com relação à distribuição taxonômica das bactérias, verifica-se a nível de filo no reator metanogênico termofílico o domínio de *Firmicutes* com abundância relativa de 86,9%. Conforme descrito em Rajendran et al. (2020), grande parte das *Firmicutes* apresentam sua temperatura ótima na faixa termofílica. Além disso, bactérias pertencentes a esse filo podem desenvolver uma oxidação sintrófica de acetato junto a metanogênicas hidrogenotróficas (MOSBÆK et al., 2016). Kim, Kim e Yun (2017) avaliaram a digestão anaeróbia de resíduos alimentares sob condição termofílica e mesofílica, e verificaram em ambas domínio do filo *Firmicutes*. No entanto, os autores observaram com o aumento da TCO um domínio mais acentuado de *Firmicutes* no reator termofílico. Além de *Firmicutes*, foram identificados os filos *Proteobacteria* (5,0%), *Bacteroidetes* (3,1%) e *Nitrospirae* (1,6%).

No reator mesofílico, *Proteobacteria* (49,5%) e *Bacteroidetes* (20,3%) foram os filos que apresentaram maior abundância relativa, estando em concordância com Gomes et al. (2021) que afirmaram que essas bactérias prevalecem em condições mesofílicas. *Proteobacterias* são conhecidas por serem bactérias consumidoras de glicose, propionato, butirato e acetato (ARIESYADY; ITO; OKABE, 2007) e *Bacteroidetes* por atuar na etapa de hidrólise, degradando proteínas e convertendo carboidratos em acetato (RIVIÈRE et al., 2009). *Spirochaetes* (9,6%), *Firmicutes* (7,1%), *Synergistetes* (5,0%), *Parcubacteria* (3,5%), *Cloacimonetes* (2,6%) e *Actinobacteria* (1,3%) também foram encontradas no reator mesofílico, confirmando mais uma vez maior variedade de microrganismos neste reator do que no reator termofílico, conforme ilustrado na Figura 36.





**Figura 36** – Abundância relativa dos filos do domínio bactéria no RS-T e RS-M na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

Comparando a composição do domínio bactéria do primeiro estágio com o do segundo estágio, observa-se uma semelhança entre os reatores termofílicos (RA-T e RS-T) com relação ao predomínio de *Firmicutes* (86,9% e 78,0%). No entanto, identifica-se maior abundância relativa de *Proteobacterias* no primeiro estágio (19%) do que no RS-T (5,0%). Tal fato pode ser devido à alimentação do reator do primeiro estágio apresentar maior quantidade de substratos na forma de carboidratos e glicerol, enquanto o reator de segundo estágio é composto por uma grande quantidade de AOV. Porém, com relação à distribuição dos principais filos do RA-T e do RS-M, verifica-se uma discrepância, sendo os filos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* os mais dominantes no RS-M. Cabe ressaltar que os reatores termofílicos (RA-T e RS-T) foram inoculados com o mesmo lodo termofílico, enquanto o reator metanogênico mesofílico foi inoculado com lodo mesofílico diferente do aplicado no RA-T e RS-T.

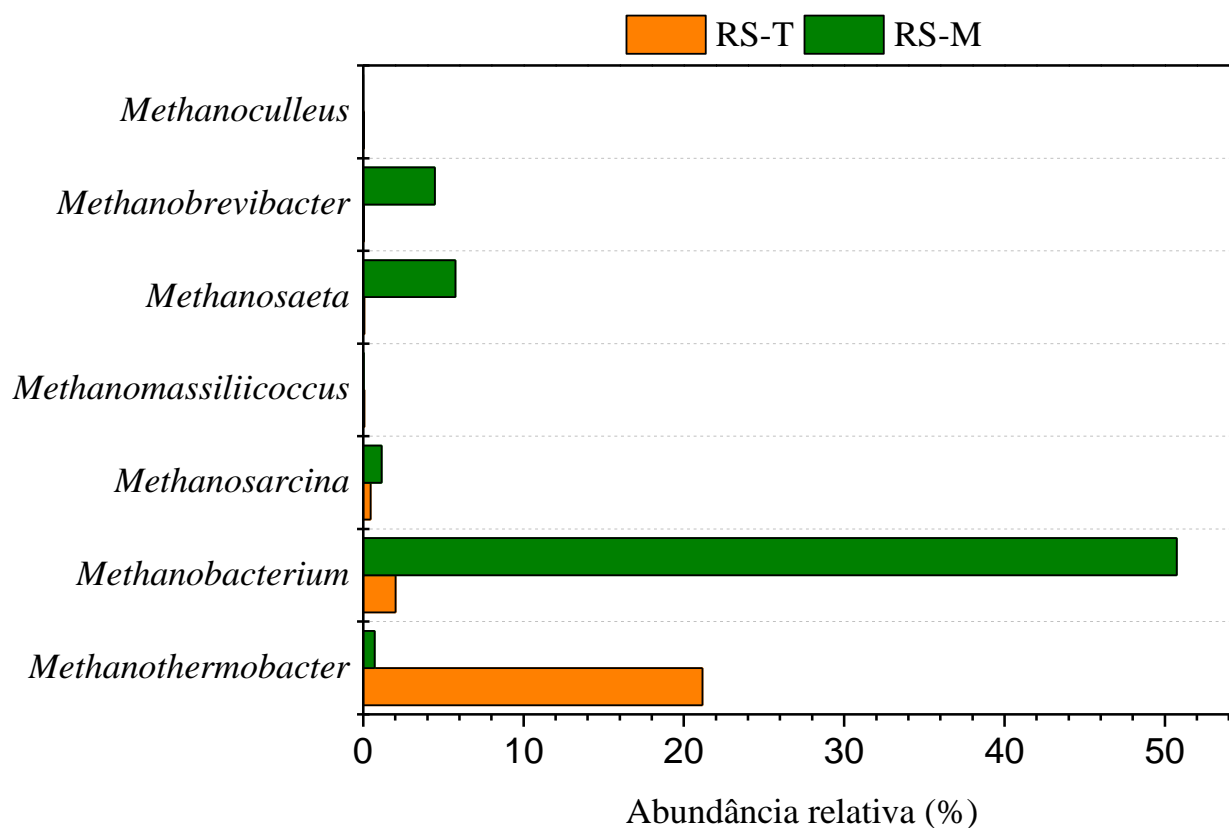
A nível de gênero, no reator metanogênico termofílico, os únicos gêneros identificados com abundância relativa superior a 1% foram *unidentified\_Nitrospiraceae* (1,6%) e *Blvii28\_wastewater-sludge\_group* (1,2%). Bactérias da família *Nitrospiraceae* são descritas como oxidantes de nitrito, ferro ferroso e redutoras de sulfato, e identificadas em reatores anaeróbios por seu papel na degradação de compostos orgânicos (DAIMS, 2014), enquanto

*Blvii28\_wastewater-sludge\_group* são relacionadas a degradação de carboidratos para produção de H<sub>2</sub> e acetato (SU et al., 2014). Apesar de representarem uma baixa parcela das bactérias do RS-T, verifica-se que esses microrganismos desempenham papel na produção de H<sub>2</sub> e AOV, que posteriormente podem ser convertidos em metano. O fato do RS-T ter sido operado em pH alcalino pode ter contribuído para que bactérias comumente identificadas em processos fermentativos, como *Clostridium*, *Enterobacter* e *Lactobacillus*, não tenham se desenvolvido expressivamente e, assim, apresentado baixas abundâncias relativas (0,25%, 0,46% e 0,58%, respectivamente), uma vez que pH ácido é o mais apropriado para crescimento desses microrganismos e realização de suas atividades metabólicas (GIRAUD; LELONG; RAIMBAULT, 1991; FU; MATHEWS, 1999; ZIGOVÁ; ŠTURDÍK, 2000; FABIANO; PEREGO, 2002; ZHU; YANG, 2004; KHANNA et al., 2011). No entanto, examinando a distribuição dos microrganismos a nível de família, verifica-se elevada abundância relativa de *Defluviitaleaceae* (76,8%). *Defluviitaleaceae* são bactérias conhecidas pela produção de H<sub>2</sub> e produção de acetato, formato, butirato e isobutirato na fermentação de glicose (JABARI et al., 2012; MA et al., 2017). Assim, as concentrações de ácido acético (28,8 mgHAc.L<sup>-1</sup>) e ácido isobutírico (103,8 mgHIsBu.L<sup>-1</sup>) verificadas no efluente do RS-T podem ser atribuídas a atividade das bactérias pertencentes a família *Defluviitaleaceae*.

No reator mesofílico foi possível identificar uma maior quantidade de gêneros com abundância relativa superior a 1%, sendo estes: *Smithella* (24,7%), *Geobacter* (18,4%), *unidentified\_Spirochaetaceae* (9,0%), *Lentimicrobium* (7,8%), *Blvii28\_wastewater-sludge\_group* (3,8%), *unidentified\_Synergistaceae* (2,2%), *Desulfomicrobium* (1,9%) e *Aminivibrio* (1,3%). As bactérias do gênero *Smithella* são degradadoras de propionato que atuam sintroficamente com microrganismos metanogênicos (*Methanospirillum hungatei*) para geração de metano (LIU et al., 1999). Porém, conforme apontado por Liu et al. (1999), a produção de metano gerada pelo sintrofismo entre esses microrganismos é menor do que o produzido por *Syntrophobacter* (bactéria oxidante de propionato) e *Methanospirillum hungatei*. Todavia, de acordo com os autores, o sintrofismo entre *Smithella* e *Methanospirillum* resultou em maior concentração de acetato e baixa concentração de butirato. Como não foi detectada concentração de ácido propiônico no RS-M na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, pode-se assumir que o gênero *Smithella*, dominante no RS-M, colaborou para total degradação de ácido propiônico e para produção de metano por meio de sua atuação sintrófica junto a microrganismos metanogênicos. O menor rendimento de metano no RS-M determinado nesta TCO pode ter sido resultante da atividade desses microrganismos, uma vez que foi atestado produção de metano mais baixa por meio da cooperação de *Smithella* e

*Methanospirillum* (LIU et al., 1999). *Smithella*, *Geobacter*, *Mesotoga* e *Syntrophobacter* também demonstraram uma relação sintrófica junto a *Methanosaeta* e *Methanobacterium* para produção de metano, segundo Liu et al. (2019). *Geobacter* foi identificada no RS-M com abundância relativa de 18,4% e são descritas na literatura como bactérias capazes de atuarem na transferência direta de elétrons interespecies (DIET) junto a *Methanobacterium* e *Methanospirillum* (LIN et al., 2017), *Methanosaeta* (ROTARU et al., 2014a) e *Methanosarcina* (ROTARU et al., 2014b) a partir da degradação de etanol para conversão em metano. Demais microrganismos detectados no RS-M com abundância relativa inferior a 10% também atuam sintroficamente junto a microrganismos metanogênicos para produção de metano. Os gêneros da família *Synergistaceae* possuem capacidade de converter aminoácidos em AOV e contribuir de maneira sintrófica com metanogênicas (FERGUSON; COULON; VILLA, 2016), sendo observada sua presença na digestão anaeróbia de águas residuárias ricas em lipídeos (NAKASAKI et al., 2020). *Desulfomicrobium* são bactérias redutoras de sulfato capazes de produzir acetato e CO<sub>2</sub> em processos fermentativos (COPELAND et al., 2009), e apresentar uma relação sintrófica com metanogênicas acetoclásticas, com por exemplo *Methanosaeta* (ZHANG et al., 2019). A família *Spirochaetaceae* também foi descrita na literatura como microrganismos que atuam na degradação sintrófica de acetato (WANG et al., 2018; YI et al., 2020). Assim, pode-se presumir que os principais gêneros dominantes no RS-M atuaram sintroficamente com microrganismos metanogênicos para produção de metano.

Com relação ao domínio *archaea* verifica-se que o filo *Euryarchaeota* foi o mais abundante em ambas as amostras e apresentou abundância relativa de 23,9% no RS-T e 63,3% no RS-M. Ressalta-se que aproximadamente 76% e 37% de abundância relativa das amostras do RS-T e RS-M foram classificadas para o domínio *archaea*, no entanto, não foram classificados a nível de filo, classe e gênero. Na Figura 37 são apresentados os gêneros com abundância relativa acima de 1% que foram identificados no RS-T e RS-M na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Verifica-se que o reator mesofílico apresentou maior variedade de microrganismos do que o reator termofílico, em concordância com os índices de diversidade apresentados previamente (Índice de Shannon 3,3 para o RS-T e 3,8 para o RS-M). Franke-Whittle et al. (2014) analisaram a influência de elevadas concentrações de AOV em lodo mesofílico e termofílico e, assim como neste estudo, observaram maior variedade de microrganismos no reator mesofílico, sendo estes *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanobacterium* e *Methanosaeta*, enquanto o reator termofílico foi dominado por *Methanothermobacter*.



**Figura 37** – Abundância relativa dos gêneros das *archaeas* metanogênicas identificadas no RS-T e RS-M na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

No reator termofílico, o gênero *Methanothermobacter* foi o que apresentou maior abundância relativa de 21,2%. *Methanothermobacter* são *archaeas* metanogênicas termofílicas que produzem CH<sub>4</sub> a partir de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, e são frequentemente dominantes em processos termofílicos nos quais ocorre a injeção de H<sub>2</sub> para melhoramento na produção de CH<sub>4</sub> (FONTANA et al., 2018b; LI et al., 2020). Fontana et al. (2018b) avaliaram a digestão anaeróbia de soro de queijo com injeção de H<sub>2</sub> para estimular a produção de CH<sub>4</sub> em reator CSTR sob condição termofílica em processo em estágio único e em dois estágios. Os autores observaram maior abundância relativa do gênero *Methanothermobacter* nos dois reatores metanogênicos, porém no reator de segundo estágio foi verificada relação sintrófica entre *Coprothermobacter* e *Methanothermobacter*. A predominância de *Methanothermobacter* também pode ser verificada sob elevadas TCO (ZHANG et al., 2019). Zhang et al. (2019) estudaram a digestão anaeróbia de resíduo de coalhada de soja sob condição termofílica e mesofílica e verificaram com aumento na TCO uma mudança na comunidade microbiana. Assim, os autores constataram no reator mesofílico o predomínio de *Methanolinea* em baixa

TCO e em altas TCO as metanogênicas *Methanomassiliicoccus* e *Candidatus\_Methanofastidiosum* prevaleceram sobre os demais microrganismos, enquanto no reator termofílico o domínio passou de *Methanolinea* para *Methanothermobacter*. Observando a comunidade metanogênica no RS-T (Figura 37) verifica-se o predomínio de *archaeas* hidrogenotróficas, não sendo detectadas com abundância relativa superior a 1% metanogênicas exclusivamente acetoclásticas. De acordo com Pasalari et al. (2021), a temperatura exerce um importante papel na estrutura da comunidade microbiana, sendo que o processo termofílico adaptativo favorece o estabelecimento de *archaeas* hidrogenotróficas e inibe o desenvolvimento de *archaeas* acetoclásticas.

No RS-M, o gênero dominante foi *Methanobacterium* com 50,7% de abundância relativa. No RS-T também foi identificado *Methanobacterium*, porém em menor abundância relativa (2,0%). *Methanobacterium* são *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas frequentemente identificadas em reatores metanogênicos (PASALARI et al., 2021). A alta abundância relativa de *Methanobacterium* no RS-M pode ser devido às relações sintróficas que esses microrganismos podem estabelecer com as bactérias *Smithella* e *Geobacter*, (LIN et al., 2017; LIU et al., 2019), as quais foram as bactérias de maior abundância relativa no RS-M. Ainda foram detectados no reator mesofílico os gêneros *Methanosaeta* (5,8%), *Methanobrevibacter* (4,5%) e *Methanosarcina* (1,1%).

Conforme pode ser observado nos dois reatores metanogênicos do processo em dois estágios, os microrganismos hidrogenotróficos compuseram a maior parcela dos microrganismos identificados, independente da temperatura. Este resultado está de acordo com estudos prévios a respeito da digestão anaeróbia de soro de queijo no qual hidrogenotróficos demonstraram maior domínio tanto em condição termofílica quanto em condição mesofílica (TREU et al., 2019). Demais trabalhos da literatura também apontam o predomínio de gêneros produtores de CH<sub>4</sub> a partir de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> na digestão anaeróbia de soro de queijo (FONTANA et al., 2018b; CHARALAMBOUS et al., 2020) e de glicerol (YANG; TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2008; WATANABE et al., 2013). O fato de microrganismos metanogênicos consumidores de H<sub>2</sub> terem sobressaído aos microrganismos acetoclásticos na co-digestão anaeróbia de soro de queijo e glicerol em dois estágios pode indicar que o consumo de ácido acético tenha ocorrido por bactérias oxidantes de acetato sintrófico (SAOB).

Analisando os microrganismos identificados no RS-T e RS-M, verifica-se que o domínio do filo *Firmicutes* aliado a *archaeas* metanogênicas do gênero *Methanothermobacter* no RS-T favoreceu a produção de metano gerando rendimento de 269,9 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, superior ao rendimento de 244,4 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> observado no RS-M, cuja comunidade

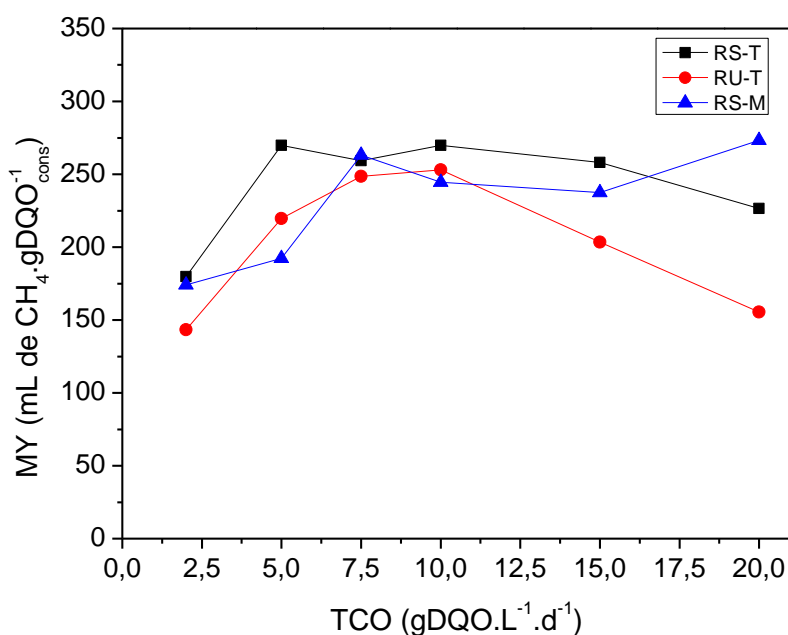
microbiana foi composta em sua maioria por bactérias do filo *Proteobacteria* e *archaea* do gênero *Methanobacterium*.

Conforme discutido anteriormente, condição termofílica pode provocar uma seleção de microrganismos, que, se estiverem adaptados ao ambiente podem beneficiar a produção de metano, porém, caso não estejam e apresentem interações ineficientes, podem levar a instabilidades (RAMOS et al., 2021). Assim, a maior diversidade constatada no reator mesofílico pode ter beneficiado o processo anaeróbio em elevada TCO (20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), na qual maiores concentrações de AOV foram inseridos. Conforme descrito previamente, no RS-M foram identificados gêneros oxidantes de propionato e acetato (*Smithella* e *Spirochaetaceae*), além de bactérias que realizam DIET (*Geobacter*) e atuam sintroficamente com metanogênicas hidrogenotróficas. Assim, o maior rendimento de metano no RS-M em 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (273,2 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>) em comparação com o RS-T em 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (226,4 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>) pode ser devido a maior diversidade e versatilidade dos microrganismos encontrados na condição mesofílica.

#### **4.4. Comparação do processo em um estágio e do processo em dois estágios na produção de CH<sub>4</sub>**

Neste tópico será realizada uma análise de qual configuração foi energeticamente mais produtiva para o processo: a operação em um estágio ou em dois estágios. No entanto, essa comparação será realizada utilizando os resultados do RS-T e do RS-M, e somente os resultados do estudo do efeito da concentração de substrato no RU-T, já que não foi avaliado o TDH no processo em dois estágios.

Ao comparar os rendimentos de metano obtidos na operação em dois estágios com os rendimentos fornecidos na operação em estágio único, verifica-se que o processo em dois estágios possibilita melhor performance do reator, conforme exibido na Figura 38. Com exceção das taxas de carregamento de 5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, nas quais o rendimento no RS-M e no RU-T foram 192,3 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e 219,6 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na TCO de 5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 244,4 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e 253,0 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, em todas as demais TCO o rendimento de metano foi maior nos reatores metanogênicos sequenciais do que no reator metanogênico de estágio único.



**Figura 38** - Comparação do rendimento de metano observado no RS-T, RU-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH de 24 h

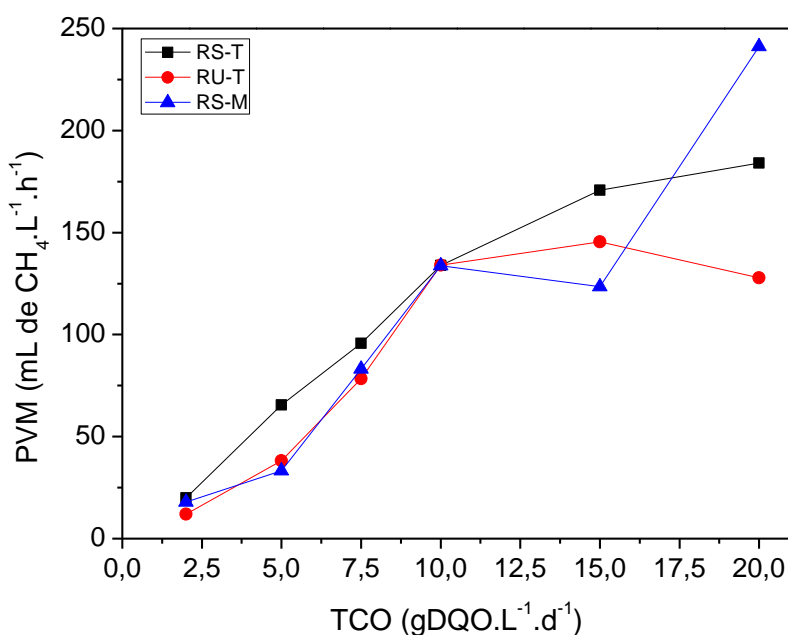
O reator sequencial termofílico, RS-T, foi o reator que apresentou o maior desempenho entre as taxas de carregamento de 2 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> a 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Rendimento médio de 269,9 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> foram observados nas TCO de 5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, sendo este 6,7% e 10,4% maior do que o obtido nos reatores metanogênico de fase única e sequencial mesofílico, respectivamente. A TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi utilizada para realização desses cálculos em razão da quantidade de matéria orgânica a ser tratada.

Conforme discutido anteriormente, nos reatores termofílicos, RU-T e RS-T, observou-se a mesma tendência para o rendimento de CH<sub>4</sub> em ambos os reatores. Dessa maneira foram constatados crescimentos no rendimento à medida que maiores taxas de carregamento foram impostas no reator até atingir um ponto de máximo, e, posteriormente, apresentar um decaimento em decorrência de elevações na TCO. Tal fato pode ser devido à intensificação da formação de produtos intermediários, como ácido acético, ácido butírico, dentre outros metabólitos, à medida que maiores taxas de carregamento foram inseridas no reator. Esses intermediários são consumidos para produção de metano, possibilitando incrementos na produção de biogás. Porém, o aumento de substratos pode gerar acúmulo demasiado de metabólitos, e afetar negativamente os microrganismos envolvidos no processo. Este mesmo comportamento foi visualizado por Ramos e Silva (2020), Zhong, Stevens e Hansen (2015), Jo, Kim e Lee (2016) e Tangkathitipong et al. (2017). Entretanto, ao contrário

do que aconteceu com os reatores termofílicos, o reator metanogênico sequencial mesofílico não teve um comportamento constante em relação ao decréscimo do rendimento após apresentar seu máximo na TCO de 7,5 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Assim, diferente do que era esperado, na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o RS-M forneceu rendimento de 273,2 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, sendo este o maior rendimento dentre todos os reatores.

Na Figura 39 têm-se um comparativo entre as PVM produzidas pelos três reatores metanogênicos. Assim como ocorreu com o rendimento, o RS-T também apresentou maiores produções volumétricas dentre os reatores metanogênicos até atingir a TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, produzindo 170,8 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ou 4,1 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, o reator sequencial mesofílico, RS-M, forneceu a maior PVM, 241,2 mL de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> ou 5,8 L de CH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Isto pode estar relacionado ao aumento da complexidade do processo, decorrente da elevada concentração de substrato imposta no reator, 20 gDQO.L<sup>-1</sup>. A diversidade microbiana presente em temperaturas mesofílicas pode ter sido favorável à produção de CH<sub>4</sub> em concentrações de substratos mais elevadas, enquanto a temperatura na faixa termofílica pode ter selecionado microrganismos que seguiram por rotas diferentes ao serem submetidos a uma maior carga operacional. As análises para determinação da comunidade microbiana presente nos reatores não foram realizadas em todas as condições. Porém, ao ser comparada a diversidade microbiana da TCO de 5 e 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no reator termofílico de fase única, identifica-se menor variedade com o aumento da concentração, diminuindo o índice de Shannon de 4,730 para 4,143, o que aponta a seleção dos microrganismos. Esta hipótese também está de acordo com a variedade de metabólitos detectados no efluente dos reatores metanogênicos sequencias na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Conforme detalhado anteriormente, no reator termofílico observa-se maior diversidade de metabólitos, o que pode indicar a seleção de microrganismos que não seriam capazes de converter os produtos intermediários em CH<sub>4</sub>, enquanto no reator mesofílico verifica-se menor variedade, fato que pode ser relacionado a uma comunidade microbiana mais heterogênea, apropriada para utilização de diferentes metabólitos.





**Figura 39** - Comparação da produção volumétrica de metano observada no RS-T, RU-T e RS-M nas TCO de 2 a 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e TDH 24 h

O fato do reator sequencial termofílico ter apresentado desempenho superior ao reator mesofílico até a TCO de 15 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, também pode estar associado ao emprego da temperatura de 55°C, uma vez que elevadas temperaturas favorecem a cinética das reações (MAO et al., 2015).

Durante a operação contínua dos reatores ocorreram algumas quedas de energia. Para o RS-M, tais quedas não acarretaram problemas, já que este reator se encontrava em temperatura ambiente. Em contrapartida, a temperatura dos reatores termofílicos caía bruscamente, o que pode ter afetado a performance do RS-T e do RU-T. Choorit e Wisarnwan (2007) analisaram a influência da temperatura na digestão anaeróbia de efluente de óleo de palma (POME) em reatores CSTR. Os autores verificaram que o reator termofílico (55°C) era sensível a perturbações na temperatura, possivelmente devido à indução de um desequilíbrio temporário de microrganismos no reator. Além disso, com decréscimos na temperatura, maior concentração de ácidos eram observadas. Já o reator mesofílico não apresentou mudanças significativas nos parâmetros medidos com as variações na temperatura.

Na Tabela 42 é apresentado um resumo com os principais resultados obtidos no estudo do efeito da concentração de substratos para o processo termofílico em fase única e o processo em duas fases empregando reator acidogênico termofílico e reator metanogênico sequencial termofílico/mesofílico. Ressalta-se que os dados apresentados na Tabela 42 não são os

melhores resultados para cada parâmetro indicado, e sim, os valores que foram observados na fase que apresentou o melhor rendimento de cada reator.

**Tabela 42** - Principais resultados obtidos no RA-T, RS-T, RS-M e RU-T

Parâmetros	Processo em dois estágios			Processo em estágio único
	RA-T	RS-T	RS-M	RU-T
TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	90	10	20	10
Remoção de DQO (%)	4,7	95,3%	89,6%	87,7%
%H <sub>2</sub> / %CH <sub>4</sub> no biogás	51,9 % de H <sub>2</sub>	67,7% de CH <sub>4</sub>	67,4% de CH <sub>4</sub>	65,8% de CH <sub>4</sub>
HY/MY	1,7 mmol H <sub>2</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	269,9 mL CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	273,2 mL CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>	253,0 mL CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup>
PVH/PVM	3,9 L H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	3,2 L CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	5,8 L CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	3,2 L CH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>

HY: rendimento de hidrogênio; MY: rendimento de metano; PVH: produção volumétrica de hidrogênio; PVM: produção volumétrica de metano

Verifica-se que além de proporcionar recuperação energética de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, a operação em dois estágios também promoveu uma conversão eficaz da matéria orgânica. Comparando os resultados do RU-T na taxa de carregamento de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e do RS-M na TCO de 20 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, conforme exposto na Tabela 42, observa-se que no RS-M, mesmo com o dobro da carga orgânica do RU-T, a remoção de matéria orgânica foi de 89,6% enquanto no reator de estágio único 87,7% da DQO foi degradada.

Perante o que foi apresentado, conclui-se que a operação em dois estágios exibiu melhor desempenho do que a operação em estágio único, fornecendo maiores produções de CH<sub>4</sub>, estando de acordo com o esperado ao separar as fases acidogênica e metanogênica e aplicar as condições mais adequadas para cada etapa.

Realizando uma análise estatística (teste de Fischer) com nível de significância 0,05, verifica-se que os rendimentos máximos observados em cada um dos reatores metanogênicos, ou seja, 253,0 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> no RU-T, 269,9 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> no RS-T e 273,2 mL CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> no RS-M não diferem significativamente. Porém, ao realizar a mesma avaliação estatística com os resultados de PVM indicadas na Tabela 42, atesta-se que as médias do RS-T e RU-T não foram significativamente diferentes entre si, mas foram significativamente diferentes da média do RS-M. Assim, dentre as estratégias adotadas neste estudo, o uso do reator acidogênico termofílico seguido de reator metanogênico sequencial

mesofílico foi mais apropriada do que o processo em estágio único sob condição termofílica, possibilitando incrementos no rendimento e produção volumétrica de  $\text{CH}_4$  de 8,0% e 81,3%, respectivamente. Esta comparação foi feita utilizando os dados correspondentes a TCO que forneceu maior rendimento para cada reator,  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o RS-M e  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o RU-T.

Ao considerar os resultados referentes à avaliação do efeito do TDH, verifica-se que os resultados alcançados no RU-T foram superiores até mesmo aos observados no processo em dois estágios. Como o processo em estágio único apresentou considerável aumento na produção de biogás ao diminuir o TDH, acredita-se que o processo em dois estágios também forneça incrementos com o decréscimo no TDH já que, como demonstrado nesse estudo, a separação da etapa acidogênica da metanogênica possibilitou um processo com menores instabilidades, menor acidificação e incrementos na produção de metano.

Analisando os resultados deste estudo para uma futura ampliação de escala, verifica-se que o processo em dois estágios apresentou um intervalo ótimo de operação ( $5$  a  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) no qual alterações na TCO não implicaram na perda de eficiência do sistema, o que demonstra a robustez que o reator RALF possui e a versatilidade do processo. Destaca-se ainda, conforme discutido anteriormente para o reator metanogênico de fase única, que o monitoramento da concentração afluente dos substratos se mostrou mais importante para o processo do que o monitoramento da vazão, uma vez que a concentração apresentou maior sensibilidade a alterações do que o TDH.

#### 4.5. Potencial energético

A determinação do potencial energético (PE) de cada processo foi feita utilizando a média das produções diárias de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ . Considerou-se para tal o PCI do  $\text{H}_2$  igual a  $120905 \text{ kJ.kg}^{-1}$  e do  $\text{CH}_4$   $50162,5 \text{ kJ.kg}^{-1}$  (NBR 15213). Na Tabela 43 são expostos os valores da média de produção diária de cada biocombustível para todas as TCO aplicadas.

Como pode ser observado na Tabela 43, conclui-se que o processo com o arranjo reator acidogênico termofílico seguido de reator metanogênico sequencial mesofílico foi o que forneceu os maiores valores energéticos, produzindo  $55,1 \text{ kJ.d}^{-1}$  no RA-T e  $377,5 \text{ kJ.d}^{-1}$  no RS-M na TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , totalizando  $432,6 \text{ kJ.d}^{-1}$ . Dessa maneira, a recuperação energética com a configuração RA-T + RS-M foi cerca de 23,5% superior a obtida com o emprego do processo em dois estágios termofílico, RA-T seguido do RS-T (em  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}$ ), e 30,2% maior do que o processo termofílico em estágio único, RU-T (em  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}$  e TDH 16 h). Em termos de energia produzida por grama de DQO aplicada, a TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$

gerou 193,4 J.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> no reator acidogênico e 8765,8 J.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> no reator metanogênico mesofílico, resultando em um total de 8959,3 J.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>, sendo aproximadamente 2 vezes a produção energética do reator de estágio único.

**Tabela 43** - Potencial energético do RA-T, RS-T, RU-T e RS-M nas TCO estudadas

RA-T		RS-T			
TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) (RA-T/RS-T)	Produção de H <sub>2</sub> (mL.h <sup>-1</sup> )	PE <sub>H<sub>2</sub></sub> (kJ.d <sup>-1</sup> )	Produção de CH <sub>4</sub> (mL.h <sup>-1</sup> )	PE <sub>CH<sub>4</sub></sub> (kJ.d <sup>-1</sup> )	Energia Total (kJ.d <sup>-1</sup> )
60/2	-	-	39,4	31,1	67,5
60/5	-	-	129,5	102,3	138,7
60/7,5	-	-	189,7	149,8	186,2
60/10	139,6	36,4	265,3	209,5	246,0
90/15	319,2	83,3	338,2	267,1	350,3
120/20	211,3	55,1	364,3	287,7	342,8

RA-T		RS-M			
TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) (RA-T/RS-M)	Produção de H <sub>2</sub> (mL.h <sup>-1</sup> )	PE <sub>H<sub>2</sub></sub> (kJ.d <sup>-1</sup> )	Produção de CH <sub>4</sub> (mL.h <sup>-1</sup> )	PE <sub>CH<sub>4</sub></sub> (kJ.d <sup>-1</sup> )	Energia Total (kJ.d <sup>-1</sup> )
60/2	-	-	35,6	28,1	64,6
60/5	-	-	65,7	51,9	88,3
60/7,5	-	-	164,7	130,1	166,5
60/10	139,6	36,4	264,7	209,1	245,5
90/15	319,2	83,3	244,5	193,1	276,4
120/20	211,3	55,1	478,0	377,5	432,6

RU-T			
TCO (gDQO.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	TDH (h)	Produção de CH <sub>4</sub> (mL.h <sup>-1</sup> )	Produção energética (kJ.d <sup>-1</sup> )
2	24	23,8	18,8
5	24	75,6	59,7
7,5	24	155,2	122,6
10	24	265,5	209,7
15	24	287,9	227,4
20	24	253,0	199,8
12	20	372,6	294,3
15	16	420,8	332,3

Considerando que o reator acidogênico tem a capacidade de produzir 0,024 mol de H<sub>2</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, conforme discutido na seção 4.2.1, e o poder calorífico inferior (PCI) do hidrogênio seja 241,81kJ.mol<sup>-1</sup> (NBR 15213), tem-se uma produção teórica de 5,8 kJ.gDQO<sup>-1</sup>. No reator metanogênico, a produção teórica equivale a 350 mL de CH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> e o PCI do metano 802,6 kJ.mol<sup>-1</sup> ou 50,16 kJ.g<sup>-1</sup>, assim 11,5 kJ.gDQO<sup>-1</sup> podem ser formados. Dessa forma, a recuperação energética teórica do processo em dois estágios se torna 17,3 kJ.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>. Sendo assim, o processo em duas fases estudado neste trabalho recuperou

51,8% da energia fornecida pelos substratos. Comparando somente o desempenho do reator metanogênico, observa-se uma recuperação ainda maior, cerca de 76,2% da energia possível de ser fornecida na fase metanogênica.

Li e Li (2019) observaram recuperações energéticas entre 59,98% e 71,06% utilizando água residuária de melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e TCO de 18 a 36 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Cheng et al. (2016) obtiveram eficiência de conversão de energia de 56,6% estudando a co-digestão de resíduo alimentar e lodo de esgoto.

Observa-se na literatura conversões de energia por grama de DQO aplicada semelhantes a produção de 8959,3 J.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> verificada neste trabalho. Ramos e Silva (2020) atestaram ganho energético de 6902 J.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> na TCO de 10 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> investigando a digestão anaeróbia da vinhaça de cana de açúcar em processo dois estágios. Também estudando a vinhaça de cana-de-açúcar em dois estágios, Ferraz Junior et al. (2016) obtiveram 6600 J.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub> e Fuess et al. (2017) observaram produção de 9780 J.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>. Volpini et al. (2018) constataram recuperação de 13,6 kJ.gDQO<sup>-1</sup><sub>apli</sub>, o que corresponde a um aumento de 38,8% em relação ao processo em estágio único.

Lovato et al. (2020) avaliando a co-digestão de soro de queijo e glicerina em dois estágios averiguaram ganho de 7,0 kJ.gDQO<sup>-1</sup>. Contrariamente ao apurado neste trabalho e nos trabalhos de Ramos e Silva (2020), Ferraz Júnior (2016), Fuess et al. (2017) e Volpini et al. (2018), o processo em uma fase exibiu maior produção de energia do que o realizado com separação de fases, gerando 12,0 kJ.gDQO<sup>-1</sup>.

Dessa maneira, conclui-se que o processo em dois estágios para a co-digestão de soro de queijo e glicerol foi mais vantajoso energeticamente do que a realização da digestão anaeróbia em estágio único. Além disso, a adoção de condição termofílica em reator acidogênico no primeiro estágio, seguido de reator metanogênico mesofílico no segundo estágio decorreu em melhores resultados. Ressalta-se que neste trabalho não foi realizado o cálculo da energia líquida gerada, porém para determinação da energia líquida e posterior análise da viabilidade econômica do processo deve-se levar em consideração o gasto energético para aquecimento dos reatores termofílicos.

## 5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados nesta pesquisa, pode-se concluir que a co-digestão do soro de queijo com o glicerol é uma alternativa adequada para o tratamento e recuperação energética desses subprodutos, oferecendo bom rendimento e produção volumétrica de  $H_2$  e  $CH_4$  ao comparar com resultados da literatura.

O aumento na TCO por meio de acréscimos na concentração de substratos foi favorável a produção de  $H_2$  e  $CH_4$ , mostrando-se coerente com o proposto na Hipótese 1 deste trabalho. No reator acidogênico, o máximo rendimento e produção volumétrica de  $H_2$  ocorreram na TCO de  $90 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , sendo iguais a  $46 \text{ mL } H_2.\text{gDQO}^{-1}$  e  $3,9 \text{ L } H_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente. O maior rendimento de  $CH_4$  nos reatores metanogênico sequencial termofílico ( $269,9 \text{ mL } CH_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) e metanogênico termofílico de estágio único ( $253,0 \text{ mL } CH_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) ocorreu na TCO de  $10 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , enquanto no reator metanogênico sequencial mesofílico foi na TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ( $273,2 \text{ mL } CH_4.\text{gDQO}^{-1}$ ). Já a máxima PVM no reator metanogênico de estágio único foi observada na TCO de  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ( $3,5 \text{ L } CH_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e nos reatores metanogênicos de dois estágios na TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  ( $4,4 \text{ L } CH_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o reator termofílico e  $5,8 \text{ L } CH_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o reator mesofílico).

Com relação ao efeito do TDH no reator metanogênico de estágio único observa-se que o decréscimo de 24 h para 16 h não afetou a remoção de matéria orgânica e consumo de substratos. Porém, a aplicação de TDH inferiores a 24 h resultou em maiores produções de biogás, sendo o máximo rendimento de metano exibido no TDH de 20 h ( $292,5 \text{ mL } CH_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) e a maior PVM no TDH de 16 h ( $5,1 \text{ L } CH_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), demonstrando como o reator RALF pode ser operado de forma estável em baixos TDH. Este resultado contradiz a Hipótese 2, na qual foi suposto a ocorrência de instabilidades no processo e queda de desempenho em função do emprego de menores TDH.

Comparando os processos em estágio único e em dois estágios, verifica-se que o processo em estágio único resultou em concentrações mais elevadas de ácidos orgânicos voláteis do que o processo em dois estágios. No que diz respeito à conversão de carboidratos e glicerol, os reatores mostraram bom desempenho em todas as fases, alcançado consumos superiores a 90%. A remoção de matéria orgânica foi mais eficiente com a separação de fases, variando entre 89 – 95% e 86 – 98% nos reatores metanogênicos sequenciais termofílico e mesofílico, respectivamente, enquanto no processo em estágio único a remoção de DQO variou entre 63 – 88%. Com relação ao rendimento e produção volumétrica de metano, observou-se melhor performance do processo em dois estágios. Tais fatos podem ser decorrentes de um

maior desequilíbrio entre a produção de ácidos e a atividade dos microrganismos metanogênicos no processo em estágio único, além do fato da separação de fases no processo em dois estágios possibilitar a operação dos reatores nas condições mais adequadas para cada grupo de microrganismos. Dessa forma, a Hipótese 3, a qual refere-se ao melhor desempenho do processo em dois estágios em comparação com o processo em estágio único, foi confirmada, sendo a produção de  $H_2$  no reator acidogênico associada a maior abundância relativa do gênero *Thermoanaerobacterium* e presença dos gêneros *Clostridium* e *Pseudomonas*. Nos reatores metanogênicos, *Methanothermobacter* foi o gênero com maior abundância relativa no reator metanogênico sequencial termofílico, enquanto no reator metanogênico sequencial mesofílico e reator metanogênico termofílico de estágio único o gênero *Methanobacterium* foi o mais abundante. Em todos os reatores metanogênicos verificou-se maior abundância relativa de *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas, o que pode indicar que a produção de  $CH_4$  tenha ocorrido preferencialmente pelo consumo de  $CO_2$  e  $H_2$ .

No processo em dois estágios, verificou-se que a condição termofílica no reator metanogênico de segundo estágio exibiu melhores resultados do que a mesofílica até a TCO de  $15 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , e que a partir desta TCO, o reator mesofílico passou a apresentar melhor desempenho, contradizendo a Hipótese 4 de que o reator metanogênico sequencial termofílico apresentaria resultados superiores ao reator metanogênico sequencial mesofílico em todas as condições. Este comportamento pode ser devido à maior diversidade de microrganismos em reatores mesofílicos, que possibilita maior versatilidade em relação a conversão de diferentes intermediários produzidos na acidogênese. Contrastando a operação do reator metanogênico sequencial mesofílico com a operação do reator metanogênico termofílico de estágio único em suas melhores condições, verifica-se incrementos de 8% e 81,3% no rendimento e produção volumétrica de  $CH_4$ , respectivamente. Analisando de maneira energética os processos de digestão anaeróbia apresentados neste trabalho, verifica-se que a TCO de  $20 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  imposta na configuração em dois estágios, reator acidogênico termofílico + reator metanogênico sequencial mesofílico, possibilitou a produção de  $432,6 \text{ kJ.d}^{-1}$ , sendo esta a maior produção dentre as demais.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados observados neste trabalho, sugere-se para realização de trabalhos futuros:

- Avaliar o decréscimo do TDH nos reatores metanogênicos do segundo estágio;
- Aplicar maiores concentrações de substrato ( $> 20 \text{ gDQO.L}^{-1}$ ) no reator metanogênico mesofílico do processo em dois estágios;
- Variar a proporção dos substratos na co-digestão de soro e queijo e glicerol em reator RALF;
- Investigar a população microbiana na melhor condição do reator mesofílico ( $20 \text{ gDQO.L}^{-1}$  e TDH de 24 h), e nas demais fases avaliadas;
- Aplicar resíduos *in natura* (soro de queijo coletado de laticínios e glicerol bruto);
- Realizar a avaliação econômica dos processos e determinação da configuração (estágio único ou dois estágios) mais adequada economicamente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, J. N.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Biomethane production by thermophilic co-digestion of sugarcane vinasse and whey in an AnSBBR: Effects of composition, organic load, feed strategy and temperature. **Journal of Environmental Management**, v. 251, p. 109606, 2019.
- ALBUQUERQUE, M. F. G. **Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano**. Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.
- ALGAPANI, D. E.; QIAO, W.; RICCI, M.; BIANCHI, D.; M. WANDERA, S.; ADANI, F.; DONG, R. Bio-hydrogen and bio-methane production from food waste in a two-stage anaerobic digestion process with digestate recirculation. **Renewable Energy**, v. 130, p. 1108–1115, 2019.
- ALVAREZ-GUZMÁN, C. L.; CISNEROS-DE LA CUEVA, S.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, V. E.; SMOLIŃSKI, A.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A. Biohydrogen production from cheese whey powder by *Enterobacter asburiae*: Effect of operating conditions on hydrogen yield and chemometric study of the fermentative metabolites. **Energy Reports**, v. 6, p. 1170–1180, 2020.
- AMORIM, E. L. C. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leite fluidificado**. Universidade de São Paulo, 2009.
- AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1248–1263, 2012.
- AMORIM, N. C. S.; ALVES, I.; MARTINS, J. S.; AMORIM, E. L. C. Biohydrogen production from cassava wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 603–612, 2014.
- ANGELIDAKI, I.; TREU, L.; TSAPEKOS, P.; LUO, G.; CAMPANARO, S.; WENZEL, H.; KOUGIAS, P. G. Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 452–466, 2018.
- ANP. **Mistura de biodiesel ao diesel passa a ser de 13% a partir de hoje (1/3)**. Disponível em [https://www.gov.br/anp/pt-br/canais\\_atendimento/imprensa/noticias-comunicados/mistura-de-biodiesel-ao-diesel-passa-a-ser-de-13-a-partir-de-hoje-1-3](https://www.gov.br/anp/pt-br/canais_atendimento/imprensa/noticias-comunicados/mistura-de-biodiesel-ao-diesel-passa-a-ser-de-13-a-partir-de-hoje-1-3).

Acesso em: abril 2021

- ANTONELLI, J.; LINDINO, A.; RODRIGUES DE AZEVEDO, J. C.; NELSON, S.; SOUZA, M. DE; CREMONEZ, P. A.; ROSSI, E. Biogas production by the anaerobic digestion of whey. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 463–467, 2016.
- ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 15, p. 5227–5233, 2008.
- ANUKAM, A.; MOHAMMADI, A.; NAQVI, M.; GRANSTRÖM, K. A Review of the Chemistry of Anaerobic Digestion: Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. **Processes**, v. 7, p. 504, 2019.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association, 2012.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 755–781, 2008.
- ARIESYADY, H.; ITO, T.; OKABE, S. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1554–1568, 2007.
- ASTALS, S.; ARISO, M.; GALÍ, A.; MATA-ALVAREZ, J. Co-digestion of pig manure and glycerine: Experimental and modelling study. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1091–1096, 2011.
- ASUNIS, F.; GIOANNIS, G. DE; DESSÌ, P.; ISIPATO, M.; LENS, PIET N L; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; ROSSI, A.; SPIGA, D. The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. **Journal of Environmental Management**, v. 276, p. 111240, 2020.
- ASUNIS, F.; GIOANNIS, G. DE; ISIPATO, M.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; ROSSI, A.; SPIGA, D. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121722, 2019.
- BABA, Y.; TADA, C.; WATANABE, R.; FUKUDA, Y.; CHIDA, N.; NAKAI, Y. Anaerobic

- digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 342–348, 2013.
- BALAGUER, M. D.; CASSÚ, C.; VICENT, T.; PARÍS, J. M. Start-up of an UASB reactor treating potato-starch wastewater using an alkalimetric follow-up procedure. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 6, p. 389–392, 1992.
- BARBIRATO, F.; CAMARASA-CLARET, C.; GRIVET, J. P.; BORIES, A. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 786–793, 1995.
- BARROS, A. R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos**, p. 119, 2009.
- BARROS, A. R.; CAVALCANTE DE AMORIM, E. L.; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 8, p. 3379–3388, abr. 2010.
- BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 59–65, 2012.
- BARROS, V. G. DE; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. DE. Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 628–639, 2016.
- BEZERRA, R. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CANTO, C. S. A.; ZAIAT, M. Effect of organic load on the performance and methane production of an AnSBBR treating effluent from biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 347–368, 2011.
- BI, S.; HONG, X.; YANG, H.; YU, X.; FANG, S.; BAI, Y.; LIU, J.; GAO, Y.; YAN, L.; WANG, W.; WANG, Y. Effect of hydraulic retention time on anaerobic co-digestion of cattle manure and food waste. **Renewable Energy**, v. 150, p. 213–220, 2020.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Microbial production of 1,3-

- propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 289–297, 1999.
- BLANCO, V. M. C.; OLIVEIRA, G. H. D.; ZAIAT, M. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor : Performance evaluation and kinetic modeling. **Renewable Energy**, v. 139, p. 1310–1319, 2019.
- BONDIOLI, P.; BELLA, L. DELLA. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 3, p. 153–157, 2005.
- BOSIO, M. **Produção de hidrogênio e metabólitos em reator anaeróbico de leite fluidizado e em reator de leite granular expandido a partir de glicerol**. Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- BUITRÓN, G.; KUMAR, G.; MARTINEZ-ARCE, A.; MORENO, G. Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H<sub>2</sub>-SBR + CH<sub>4</sub>-UASB) using tequila vinasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 19249–19255, 2014.
- BULL, M. A.; STERRITT, R. M.; LESTER, J. N. An evaluation of single- and separated-phase anaerobic industrial wastewater treatment in fluidized bed reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 9, p. 1054–1065, 1984.
- CABRERA-DÍAZ, A.; PEREDA-REYES, I.; OLIVA-MERENCIO, D.; LEBRERO, R.; ZAIAT, M. Anaerobic Digestion of Sugarcane Vinasse Through a Methanogenic UASB Reactor Followed by a Packed Bed Reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 4, p. 1127–1145, 2017.
- CABROL, L.; MARONE, A.; TAPIA-VENEGAS, E.; STEYER, J. P.; RUIZ-FILIPPI, G.; TRABLY, E. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 2, p. 158–181, 2017.
- CALDWELL, M. E.; ALLEN, T. D.; LAWSON, P. A.; TANNER, R. S. *Tolomonas osonensis* sp. nov., isolated from anoxic freshwater sediment, and emended description of the genus *Tolomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2659–2663, 2011.
- CAMPANARO, S.; TREU, L.; KOUGIAS, P. G.; LUO, G.; ANGELIDAKI, I. Metagenomic binning reveals the functional roles of core abundant microorganisms in twelve full-scale

- biogas plants. **Water Research**, v. 140, p. 123–134, 2018.
- CAMPOS, J. R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES, 1999.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of The Total Environment**, v. 445–446, p. 385–396, 2013.
- CASTELLÓ, E.; FERRAZ-JUNIOR, A.D.N.; ANDREANI, C.; ANZOLA-ROJAS, M. del P.; BORZACCONI, L.; BUITRÓN, G.; CARRILLO-REYES, J.; GOMES, S.D.; MAINTINGUER, S.I.; MORENO-ANDRADE, I.; PALOMO-BRIONES, R.; RAZO-FLORES, E.; SCHIAPPACASSE-DASATI, M.; TAPIA-VENEGAS, E.; VALDEZ-VÁZQUEZ, I.; VESGA-BARON, A.; ZAIAT, M.; ETCHEBEHERE, C. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, p. 109602, 2020.
- CASTELLÓ, E.; BRAGA, L.; FUENTES, L.; ETCHEBEHERE, C. Possible causes for the instability in the H<sub>2</sub> production from cheese whey in a CSTR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 5, p. 2654–2665, 2018.
- CASTRILLÓN, L.; FERNÁNDEZ-NAVA, Y.; ORMAECHEA, P.; MARAÑÓN, E. Optimization of biogas production from cattle manure by pre-treatment with ultrasound and co-digestion with crude glycerin. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7845–7849, 2011.
- CHARALAMBOUS, P.; SHIN, J.; SHIN, S. G.; VYRIDES, I. Anaerobic digestion of industrial dairy wastewater and cheese whey: Performance of internal circulation bioreactor and laboratory batch test at pH 5-6. **Renewable Energy**, v. 147, p. 1–10, 2020.
- CHEN, Y.; YIN, Y.; WANG, J. Comparison of fermentative hydrogen production from glycerol using immobilized and suspended mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 13, p. 8986–8994, 2021.
- CHENG, J.; DING, L.; LIN, R.; YUE, L.; LIU, J.; ZHOU, J.; CEN, K. Fermentative biohydrogen and biomethane co-production from mixture of food waste and sewage sludge: Effects of physiochemical properties and mix ratios on fermentation performance. **Applied Energy**, v. 184, p. 1–8, 2016.
- CHERNICHARO, C. A. DE L. **Reatores Anaeróbios**. 2º ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2007.

- CHETPATTANANONDH, P.; CHAIPRAPAT, S.; SUKSAROJ, C. Anaerobic digestion of pig manure and glycerol from biodiesel production. **International Journal of Energy and Environment**, v. 6, n. 3, p. 309–316, 2015.
- CHORIT, W.; WISARNWAN, P. Effect of temperature on the anaerobic digestion of palm oil mill effluent. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 376–385, 2007.
- CHOU, Y.; SU, J. Biogas Production by Anaerobic Co-Digestion of Dairy Wastewater with the Crude Glycerol from Slaughterhouse Sludge Cake Transesterification. **Animals**, v. 9, p. 1–17, 2019.
- CHYNOWETH, D. P.; OWENS, J. M.; LEGRAND, R. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. **Renewable Energy**, v. 22, n. 1–3, p. 1–8, 2001.
- CISNEROS-PÉREZ, C.; ETCHEBEHERE, C.; CELIS, L. B.; CARRILLO-REYES, J.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; RAZO-FLORES, E. Effect of inoculum pretreatment on the microbial community structure and its performance during dark fermentation using anaerobic fluidized-bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9589–9599, 2017.
- COFRÉ, O.; RAMÍREZ, M.; GÓMEZ, J. M.; CANTERO, D. Pilot scale fed-batch fermentation in a closed loop mixed reactor for the biotransformation of crude glycerol into ethanol and hydrogen by *Escherichia coli* MG1655. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 37–47, 2016.
- COPELAND, A.; SPRING, S.; GÖKER, M.; SCHNEIDER, S.; LAPIDUS, A.; DEL RIO, T.G.; TICE, H.; CHENG, J.F.; LUCAS, S.; CHEN, F.; NOLAN, M.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; OVCHINNIKOVA, G.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y.J.; JEFFRIES, C.C.; MEINCKE, L.; SIMS, D.; BRETTIN, T.; DETTER, J.C.; HAN, C.; CHAIN, P.; BRISTOW, J.; EISEN, J.A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N.C.; KLENK, H.P.; LUCAS, S. Complete genome sequence of *Desulfomicrobium baculatum* type strain (XT). **Standards in Genomic Sciences**, v. 1, n. 1, p. 29–37, 2009.
- COSTA, T. B. **Produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol bruto e cultura mista em reatores anaeróbios de leito fluidizado termofílicos**. Universidade Federal de São Carlos, 2017.

- COSTA, T. B.; SIMÕES, A. N.; MENEZES, C. A.; SILVA, E. L. Anaerobic Biodegradation of Biodiesel Industry Wastewater in Mesophilic and Thermophilic Fluidized Bed Reactors : Enhancing Treatment and Methane Recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2021.
- COTA-NAVARRO, C. B.; CARRILLO-REYES, J.; DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; RAZO-FLORES, E. Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 367–374, 2011.
- CREMONEZ, P. A.; TELEKEN, J. G.; WEISER MEIER, T. R.; ALVES, H. J. Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 281, 2021.
- CRUZ-SALOMÓN, A.; RÍOS-VALDOVINOS, E.; POLA-ALBORES, F.; LAGUNAS-RIVERA, S.; CRUZ-RODRÍGUEZ, R. I.; CRUZ-SALOMÓN, K. DEL C.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. M. E.; DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, M. E. Treatment of cheese whey wastewater using an expanded granular sludge bed (EGSB) bioreactor with biomethane production. **Processes**, v. 8, n. 8, 2020.
- DAIMS, H. The Family Nitrospiraceae. *In*: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 733–749.
- DAREIOTI, M. A.; KORNAROS, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure in a two-stage CSTR system: Effect of hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 553–562, 2015.
- DAREIOTI, M. A.; VAVOURAKI, A. I.; TSIGKOU, K.; KORNAROS, M. Assessment of Single- vs. Two-Stage Process for the Anaerobic Digestion of Liquid Cow Manure and Cheese Whey. **Energies**, v. 14, n. 17, p. 5423, 2021.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 21, p. 6046–6057, 2008.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; COTA-NAVARRO, C. B.; ROSALES-COLUNGA, L. M.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A. DE; RAZO-FLORES, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen**

- Energy**, v. 34, n. 10, p. 4296–4304, 2009.
- DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. Universidade de São Paulo, 1987.
- DILALLO, R.; ALBERTSON, O. Volatile acids by direct trititation. **Jornal Water Pollution Control Federation**, v. 33, p. 356–365, 1961.
- DOUNAVIS, A. S.; NTAIKOU, I.; KAMILARI, M.; LYBERATOS, G. Production of Bio-Based Hydrogen Enriched Methane from Waste Glycerol in a Two Stage Continuous System. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 4, p. 677–689, 2016.
- DOUNAVIS, A. S.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G. Production of biohydrogen from crude glycerol in an upflow column bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 701–708, 2015.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- DUTTA, S. A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1148–1156, 2014.
- DYKSMA, S.; JANSEN, L.; GALLERT, C. Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2020.
- ELANGO VAN, C.; SEKAR, A. S. S. Performance evaluation of upflow anaerobic sludge blanket reactor process for dairy wastewater treatment. **Journal of Environmental Biology**, v. 36, n. 6, p. 1305–1310, 2015.
- ENZMANN, F.; MAYER, F.; ROTHER, M.; HOLTMANN, D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2018.
- EPE. Balanço Energético Nacional 2020: Ano base 2019. **Rio de Janeiro : EPE**, p. 7–295, 2020.
- ESCALANTE, H.; CASTRO, L.; AMAYA, M. P.; JAIMES, L.; JAIMES-ESTÉVEZ, J. Anaerobic digestion of cheese whey: Energetic and nutritional potential for the dairy sector



- in developing countries. **Waste Management**, v. 71, p. 711–718, 2018.
- FABER, M. DE O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365–370, 2016.
- FABIANO, B.; PEREGO, P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 2, p. 149–156, 2002.
- FERGUSON, R. M. W.; COULON, F.; VILLA, R. Organic loading rate: A promising microbial management tool in anaerobic digestion. **Water Research**, v. 100, p. 348–356, 2016.
- FERNÁNDEZ, C.; CUETOS, M. J.; MARTÍNEZ, E. J.; GÓMEZ, X. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 55–62, 2015.
- FERNÁNDEZ, N.; MONTALVO, S.; BORJA, R.; GUERRERO, L.; SÁNCHEZ, E.; CORTÉS, I.; COLMENAREJO, M. F.; TRAVIESO, L.; RAPOSO, F. Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater. **Renewable Energy**, v. 33, n. 11, p. 2458–2466, 2008.
- FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. **Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo**. Universidade de São Paulo, 2013.
- FERRAZ JUNIOR, A. D. N.; KOYAMA, M. H.; ARAÚJO JUNIOR, M. M. DE; ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245–252, 2016.
- FERREIRA, J. S.; VOLSCHAN JR, I.; CAMMAROTA, M. C. Co-digestion of sewage sludge with crude or pretreated glycerol to increase biogas production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 21811–21821, 2018a.
- FERREIRA, J. S. **Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. Universidade Federal de São Carlos, 2014.

- FERREIRA, J. S.; VOLSCHAN JR, I.; CAMMAROTA, M. C. Enhanced Biogas Production in Pilot Digesters Treating a Mixture of Sewage Sludge, Glycerol, and Food Waste. **Energy and Fuels**, v. 32, n. 6, p. 6839–6846, 2018b.
- FERREIRA, T. B.; REGO, G. C.; RAMOS, L. R.; MENEZES, C. A. DE; SOARES, L. A.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. HRT control as a strategy to enhance continuous hydrogen production from sugarcane juice under mesophilic and thermophilic conditions in AFBRs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 36, p. 19719–19729, 2019.
- FERRER, I.; VÁZQUEZ, F.; FONT, X. Long term operation of a thermophilic anaerobic reactor: Process stability and efficiency at decreasing sludge retention time. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 2972–2980, 2010.
- FISCHER-ROMERO, C.; TINDALL, B. J.; JÜTTNER, F. *Tolumonas auensis* gen. nov., sp. nov., a Toluene-Producing Bacterium from Anoxic Sediments of a Freshwater Lake. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 183–188, 1996.
- FONTANA, A.; CAMPANARO, S.; TREU, L.; KOUGIAS, P. G.; CAPPÀ, F.; MORELLI, L.; ANGELIDAKI, I. Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes. **Water Research**, v. 134, p. 181–191, 2018a.
- FONTANA, A.; KOUGIAS, P. G.; TREU, L.; KOVALOVSKI, A.; VALLE, G.; CAPPÀ, F.; MORELLI, L.; ANGELIDAKI, I.; CAMPANARO, S. Microbial activity response to hydrogen injection in thermophilic anaerobic digesters revealed by genome-centric metatranscriptomics. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2018b.
- FRANKE-WHITTLE, I. H.; WALTER, A.; EBNER, C.; INSAM, H. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2080–2089, 2014.
- FU, S.; XU, X.; DAI, M.; YUAN, X.; GUO, R. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.
- FU, W.; MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**,

- v. 3, n. 3, p. 163–170, 1999.
- FUESS, L. T.; KIYUNA, L. S. M.; FERRAZ JUNIOR, A. D. N.; PERSINOTI, G. F.; SQUINA, F. M.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017.
- GANNOUN, H.; KHELIFI, E.; BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HAMDI, M. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6105–6111, 2008.
- GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- GHIMIRE, A.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; TRABLY, E.; ESCUDIE, R.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass : Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73–95, 2015.
- GHIMIRE, A.; LUONGO, V.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4861–4869, 2017.
- GIOANNIS, G. DE; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; SPIGA, D. Energy recovery from one- and two-stage anaerobic digestion of food waste. **Waste Management**, v. 68, p. 595–602, 2017.
- GIOANNIS, G.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. **Waste Management**, v. 33, n. 6, p. 1345–1361, 2013.
- GIRAUD, E.; LELONG, B.; RAIMBAULT, M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 96–99, 1991.
- GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582–587, 2009.
- GOLDEMBERG, J. Atualidade e Perspectivas no Uso de Biomassa para Geração de Energia. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 15–28, 2017.

- GOMES, M. M.; SAKAMOTO, I. K.; SILVA RABELO, C. A. B.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Statistical optimization of methane production from brewery spent grain: Interaction effects of temperature and substrate concentration. **Journal of Environmental Management**, v. 288, n. May 2020, 2021.
- GOMEZ-ROMERO, J.; GONZALEZ-GARCIA, A.; CHAIREZ, I.; TORRES, L.; GARCIA-PEÑA, E. I. Continuous two-staged co-digestion process for biohydrogen production from agro-industrial wastes J. **International Journal of Energy Research**, v. 40, p. 257–272, 2016.
- GOMEZ-ROMERO, J.; GONZALEZ-GARCIA, A.; CHAIREZ, I.; TORRES, L.; GARCÍA-PEÑA, E. I. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 24, p. 12541–12550, 2014.
- GULSEN, H.; TURAN, M.; ARMAGAN, B. Anaerobic fluidized bed reactor for the treatment of landfill leachates. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 39, n. 8, p. 2195–2204, 2004.
- HALLAJI, S. M.; KUROSHKARIM, M.; MOUSSAVI, S. P. Enhancing methane production using anaerobic co-digestion of waste activated sludge with combined fruit waste and cheese whey. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 19, 2019.
- HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 585–602, 1986.
- HASSAN, A. N.; NELSON, B. K. Anaerobic fermentation of dairy food wastewater. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6188–6203, 2012.
- HATTORI, S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 2, p. 118–127, 2008.
- HEFNER III, R. A. The age of energy gases. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 1, p. 1–9, 2002.
- IEA. **Aspectos das Importações de Soro de Leite no Brasil**. Disponível em <<http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=12703#:~:text=Na%20p>>

auta%20de%20importa%C3%A7%C3%B5es%20brasileiras,na%20balan%C3%A7a%20comercial%20de%201%C3%A1lcteos>. Acesso em: Abril 2021

JABARI, L.; GANNOUN, H.; CAYOL, J. L.; HAMDI, M.; FAUQUE, G.; OLLIVIER, B.; FARDEAU, M. L. Characterization of *defluviitalea saccharophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, and proposal of *defluviitaleaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. PART 3, p. 550–555, 2012.

JO, Y.; KIM, J.; LEE, C. Continuous treatment of dairy effluent in a downflow anaerobic filter packed with slag grains : Reactor performance and kinetics. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 68, p. 147–152, 2016.

KANCHANASUTA, S.; SILLAPARASSAMEE, O. Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 5, p. 3440–3446, 2017.

KARADAG, D.; KÖROLLU, O. E.; OZKAYA, B.; CAKMAKCI, M. A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 262–271, 2015.

KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 10, p. 8338–8342, 2012.

KHANNA, N.; KOTAY, S. M.; GILBERT, J. J.; DAS, D. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 1, p. 9–15, 2011.

KIM, D. H.; HAN, S. K.; KIM, S. H.; SHIN, H. S. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 15, p. 2158–2169, 2006.

KIM, J.-H.; KIM, W. *Tumebacillus soli* sp. nov., isolated from non-rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2192–2197, 2016.

KIM, M.-S.; KIM, D.-H.; YUN, Y.-M. Effect of operation temperature on anaerobic digestion

- of food waste: Performance and microbial analysis. **Fuel**, v. 209, n. February, p. 598–605, 2017.
- KOMILIS, D.; BARRENA, R.; GRANDO, R. L.; VOGIATZI, V.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X. A state of the art literature review on anaerobic digestion of food waste: influential operating parameters on methane yield. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 347–360, 2017.
- KOTHARI, R.; KUMAR, V.; PATHAK, V. V.; TYAGI, V. V. Sequential hydrogen and methane production with simultaneous treatment of dairy industry wastewater : Bioenergy profit approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4870–4879, 2017.
- KUMAR, P.; SHARMA, R.; RAY, S.; MEHARIYA, S.; PATEL, S. K. S.; LEE, J. K.; KALIA, V. C. Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 383–388, 2015.
- KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. DO. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019.
- KUO, S. C.; CHAO, Y. C.; TIEN, Y. M.; CHEN, I. C.; CHENG, S. S. Bio-hydrogen behavior of suspended and attached microorganisms in anaerobic fluidized bed. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8800–8808, 2011.
- LEE, J. H.; JUNG, M. Y.; OH, M. K. High-yield production of 1,3-propanediol from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.
- LEMBO, G.; ROSA, S.; MIRITANA, V. M.; MARONE, A.; MASSINI, G.; FENICE, M.; SIGNORINI, A. Thermophilic anaerobic digestion of second cheese whey: Microbial community response to H<sub>2</sub> addition in a partially immobilized anaerobic hybrid reactor. **Processes**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2021.
- LI, J.; BAN, Q.; ZHANG, L.; JHA, A. K. Syntrophic propionate degradation in anaerobic digestion: A review. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, n. 5, p. 843–850, 2012.
- LI, Q.; LI, Y. Coproduction of hydrogen and methane in a CSTR-IC two-stage anaerobic

- digestion system from molasses wastewater. **Water Science and Technology**, v. 79, n. 2, p. 270–277, 15 jan. 2019.
- LI, S.; LAI, C.; CAI, Y.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, J.; WANG, X. High efficiency hydrogen production from glucose/xylose by the ldh -deleted *Thermoanaerobacterium* strain. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8718–8724, 2010.
- LI, Z.; WACHEMO, A. C.; YUAN, H.; KORAI, R. M.; LI, X. Improving methane content and yield from rice straw by adding extra hydrogen into a two-stage anaerobic digestion system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 6, p. 3739–3749, 2020.
- LIMA, D. M. F.; INOUE, R. K.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Biohydrogen from cheese whey treatment in an ansbbr: Achieving process stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 397–408, 2015.
- LIMA, D. M. F.; LAZARO, C. Z.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey. **Journal of Environmental Management**, v. 169, p. 191–201, 2016.
- LIN, R.; CHENG, J.; ZHANG, J.; ZHOU, J.; CEN, K.; MURPHY, J. D. Boosting biomethane yield and production rate with graphene: The potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 345–352, 2017.
- LIU, C.; LI, H.; ZHANG, Y.; SI, D.; CHEN, Q. Evolution of microbial community along with increasing solid concentration during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 87–94, 2016.
- LIU, Y.; BALKWILL, D. L.; HENRY, C. A.; DRAKE, G. R.; BOONE, D. R. Characterization of the anaerobic propionate- degrading syntrophs *Smithella propionica*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1 999, p. 545–556, 1999.
- LIU, Y.; GU, M.; YIN, Q.; WU, G. Inhibition mitigation and ecological mechanism of mesophilic methanogenesis triggered by supplement of ferrous oxide in sulfate-containing systems. **Bioresource Technology**, v. 288, p. 121546, 2019.
- LO, K. V.; LIAO, P. H.; CHIU, C. Mesophilic anaerobic digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. **Biomass**, v. 15, n. 1, p. 45–53, 1 jan. 1988.
- LOPES, H. J. S. **Valoração de resíduos e subprodutos agroindustriais utilizando reatores anaeróbios em fermentação escura para produção de hidrogênio, etanol e ácidos**

- orgânicos**. Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- LOPES, H. J. S.; RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Co-Fermentation of Cheese Whey and Crude Glycerol in EGSB Reactor as a Strategy to Enhance Continuous Hydrogen and Propionic Acid Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 712–728, 2017.
- LÓPEZ, J. A. S.; SANTOS, M. DE LOS A. M.; PEREZ, A. F. C.; MARTIN, A. M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5609–5615, 2009.
- LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RUGGERO, L. S.; STRACIERI, L.; RATUSZNEI, S. M.; DOMINGUES RODRIGUES, J. A. Energetic feasibility of a two-stage anaerobic digestion system compared to a single-stage system treating whey and glycerin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, 2020.
- LOVATO, G.; BATISTA, L. P. P.; PREITE, M. B.; YAMASHIRO, J. N.; BECKER, A. L. S.; VIDAL, M. F. G.; PEZINI, N.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Viability of Using Glycerin as a Co-substrate in Anaerobic Digestion of Sugarcane Stillage (Vinasse): Effect of Diversified Operational Strategies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 3, p. 720–740, 2019.
- LOVATO, G.; LAZARO, C. Z.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Biohydrogen production by co-digesting whey and glycerin in an AnSBBR: Performance optimization, metabolic pathway kinetic modeling and phylogenetic characterization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 93–105, 2017.
- LOVATO, G.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M. Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 126–143, 2016.
- LU, J.; CHEN, C.; HUANG, C.; LEE, D. Glucose fermentation with biochar-amended consortium : microbial consortium shift. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 272–280, 2020.
- MA, S.; HUANG, Y.; WANG, C.; FAN, H.; DAI, L.; ZHOU, Z.; LIU, X.; DENG, Y. *Defluviitalea raffinosedens* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, saccharolytic bacterium isolated from an anaerobic batch digester treating animal manure and rice straw. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p.



- 1607–1612, 2017.
- MACDONALD, G. J. The future of petroleum as an energy resource. **Annu. Rev. Energy**, v. 15, p. 53–83, 1990.
- MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309–4317, 2008.
- MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 12198–12204, 2012.
- MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540–555, 2015.
- MARONE, A.; VARRONE, C.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MENTUCCIA, L.; ROSA, S.; SIGNORINI, A. Optimization of substrate composition for biohydrogen production from buffalo slurry co-fermented with cheese whey and crude glycerol, using microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 1, p. 209–218, 2015.
- MARQUES, T. D.; MACÊDO, W. V.; PEITER, F. S.; BONFIM, A. A. T. L.; SAKAMOTO, I. K.; CAFFARO FILHO, R. A.; DAMIANOVIC, M. H. Z.; VARESCHE, M. B. A.; SALOMON, K. R.; AMORIM, E. L. C. Influence of hydraulic retention time on hydrogen production by treating cheese whey wastewater in anaerobic fluidized bed bioreactor - An approach for developing countries. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 3, p. 1109–1118, 2019.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, L.; FONT, X.; VICENT, T. Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 1–5, 2013.
- MARU, B. T.; LÓPEZ, F.; KENGEN, S. W. M.; CONSTANTÍ, M.; MEDINA, F. Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter* sp. **Fuel**, v. 186, p. 375–384, 2016.
- MDIC. **Cadeia Agroindustrial do Leite no Brasil - Diagnóstico dos Fatores Limitantes à**

- Competitividade**. p. 162, 2018.
- MENG, X.; YUAN, X.; REN, J.; WANG, X.; ZHU, W.; CUI, Z. Methane production and characteristics of the microbial community in a two-stage fixed-bed anaerobic reactor using molasses. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1050–1059, 2017.
- METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: treatment and reuse**. 4th. ed. New York: Mc-Graw-Hill, 2003.
- MILKPOINT. **Produção brasileira de lácteos deve crescer 2% em 2020, estima USDA**. Disponível em <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/producao-brasileira-de-lacteos-crescera-2-em-2020-estima-usda-216615>>. Acesso em: abril 2021.
- MIRZOYAN, S.; TRCHOUNIAN, A.; TRCHOUNIAN, K. Hydrogen production by *Escherichia coli* during anaerobic utilization of mixture of lactose and glycerol : Enhanced rate and yield , prolonged production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 18, p. 9272–9281, 2019.
- MOCKAITIS, G.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor ( ASBR ): effects of organic loading and supplemented alkalinity. v. 79, n. J. Environ. Manage., p. 198–206, 2006.
- MONTEIRO, M. R.; KUGELMEIER, C. L.; PINHEIRO, R. S.; BATALHA, M. O.; SILVA CÉSAR, A. Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, p. 109–122, 2018.
- MOSBÆK, F.; KJELDAL, H.; MULAT, D. G.; ALBERTSEN, M.; WARD, A. J.; FEILBERG, A.; NIELSEN, J. L. Identification of syntrophic acetate-oxidizing bacteria in anaerobic digesters by combined protein-based stable isotope probing and metagenomics. **The ISME Journal**, v. 10, n. 10, p. 2405–2418, 2016.
- MOTA, V. T.; FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; TRABLY, E.; ZAIAT, M. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? **Water Research**, v. 128, p. 350–361, 2018.
- NAJAFPOUR, G. D.; KOMEILI, M.; TAJALLIPOUR, M.; ASADI, M. Bioconversion of cheese whey to methane in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, n. 1, p. 111–117, 2010.
- NAKASAKI, K.; NGUYEN, K. K.; BALLESTEROS, F. C.; MAEKAWA, T.; KOYAMA, M. Characterizing the microbial community involved in anaerobic digestion of lipid-rich

- wastewater to produce methane gas. **Anaerobe**, v. 61, p. 102082, 2020.
- NAZARETH, T. C.; OLIVEIRA PARANHOS, A. G. DE; RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Valorization of the Crude Glycerol for Propionic Acid Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor with Grounded Tires as Support Material. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 2, p. 400–413, 2018.
- NAZINA, T. N.; SOKOLOVA, D. S.; BABICH, T. L.; SEMENOVA, E. M.; BORZENKOV, I. A.; BIDZHIEVA, S. K.; MERKEL, A. Y.; KHISAMETDINOV, M. R.; TOUROVA, T. P. Phylogenetic diversity of microorganisms from the sludge of a biogas reactor processing oil-containing and municipal waste. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 87, n. 3, p. 416–424, 2018.
- NI, M.; LEUNG, M. K. H.; SUMATHY, K.; LEUNG, D. Y. C. Potential of renewable hydrogen production for energy supply in Hong Kong. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 10, p. 1401–1412, 2006.
- NIE, E.; HE, P.; ZHANG, H.; HAO, L.; SHAO, L.; LÜ, F. How does temperature regulate anaerobic digestion? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 150, p. 111453, 2021.
- NOIKE, T. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1367–1371, 2002.
- NUCHDANG, S.; PHALAKORNKULE, C. Anaerobic digestion of glycerol and co-digestion of glycerol and pig manure. **Journal of Environmental Management**, v. 101, p. 164–172, 2012.
- OLIVEIRA, J. V.; DUARTE, T.; COSTA, J. C.; CAVALEIRO, A. J.; PEREIRA, M. A.; ALVES, M. M. Improvement of Biomethane Production from Sewage Sludge in Co-digestion with Glycerol and Waste Frying Oil, Using a Design of Experiments. **Bioenergy Research**, v. 11, n. 4, p. 763–771, 2018.
- OTTAVIANO, L. M.; RAMOS, L. R.; BOTTA, L. S.; AMÂNCIO VARESCHE, M. B.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4848–4860, 2017.

- PAIDERS, M.; GRUDULS, A.; KALNINA, L.; VALUCKA, S.; DIMANTA, I.; KLEPERIS, J.; NIKOLAJEVA, V. Biogas and hydrogen production from glycerol by *Enterobacter aerogenes* and anaerobic microbial communities. **Agronomy Research**, v. 15, n. 1, p. 256–269, 2017.
- PARANHOS, A. G. O. **Produção otimizada de 1,3-propanodiol, ácido glicérol bruto e cultura mista, em reator propiônico, etanol e hidrogênio, a partir de glicérol bruto e cultura mista, em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Universidade Federal de São Carlos. 2016.
- PARANHOS, A. G. O.; SILVA, E. L. Optimized 1,3-propanediol production from crude glycerol using mixed cultures in batch and continuous reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 12, p. 1807–1816, 2018.
- PARANHOS, A. G. DE O.; SILVA, E. L. Statistical optimization of H<sub>2</sub>, 1,3-propanediol and propionic acid production from crude glycerol using an anaerobic fluidized bed reactor: Interaction effects of substrate concentration and hydraulic retention time. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, p. 105575, 2020.
- PASALARI, H.; GHOLAMI, M.; REZAEI, A.; ESRAFILI, A.; FARZADKIA, M. Perspectives on microbial community in anaerobic digestion with emphasis on environmental parameters: A systematic review. **Chemosphere**, v. 270, 2021.
- PAULA, J. C. J. DE; CARVALHO, A. F. DE; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à saga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367/368, p. 19–25, 2009.
- PAULISTA, L. O. et al. Enhancing methane yield from crude glycerol anaerobic digestion by coupling with ultrasound or *A. niger*/*E. coli* biodegradation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 2, p. 1461–1474, 2020.
- PEIXOTO, G. et al. Hydrogen and Methane Production, Energy Recovery, and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 651–671, 2012.
- PENTEADO, E. D.; LAZARO, C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137–6145, 2013.

- PEREYRA, D. DE L. A. D.; RUEGER, I. B.; BARBOSA, P. A. M. DE A.; PEITER, F. S.; SILVA FREITAS, D. M. DA; AMORIM, E. L. C. DE. Co-fermentation of glycerol and molasses for obtaining biofuels and value-added products. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 4, p. 653–660, 2020.
- PERNA, V; CASTELLO, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; LIMA, D. M. F.; BORZACCONI, L.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; ETCHEBEHERE, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 54–62, 2013.
- PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 133–140, 2012.
- POHLAND, F. G.; GHOSH, S. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two-phase concept. **Environmental Letters**, v. 1, n. 4, p. 255–266, 1971.
- POLADYAN, A.; BAGHDASARYAN, L.; TRCHOUNIAN, A. *Escherichia coli* wild type and hydrogenase mutant cells growth and hydrogen production upon xylose and glycerol co-fermentation in media with different buffer capacities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 33, p. 15870–15879, 2018.
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012.
- RAJENDRAN, K.; MAHAPATRA, D.; VENKATRAMAN, A. V.; MUTHUSWAMY, S.; PUGAZHENDHI, A. Advancing anaerobic digestion through two-stage processes: Current developments and future trends. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, n. March 2019, p. 109746, maio 2020.
- RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385–405, 2011.
- RAMOS, L. R. **Aplicação de biorreatores anaeróbios em diferentes temperaturas para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias agroindustriais**. Universidade Federal de São Carlos, 2016.
- RAMOS, L. R.; LOVATO, G.; RODRIGUES, J. A. D.; SILVA, E. L. Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: Process robustness between two-stage thermophilic-

- thermophilic and thermophilic-mesophilic systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, 2021.
- RAMOS, L. R.; MENEZES, C. A.; SOARES, L. A.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Controlling methane and hydrogen production from cheese whey in an EGSB reactor by changing the HRT. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 673–684, 2020.
- RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous Hydrogen Production from Agricultural Wastewaters at Thermophilic and Hyperthermophilic Temperatures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, p. 846–869, 2017a.
- RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Improving EGSB reactor performance for simultaneous bioenergy and organic acid production from cheese whey via continuous biological H<sub>2</sub> production. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 7, p. 983–991, 2017b.
- RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 29, p. 13081–13089, 2018.
- RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 8, p. 5239–5251, 2020.
- RAO, R.; BASAK, N. Optimization and modelling of dark fermentative hydrogen production from cheese whey by *Enterobacter aerogenes* 2822. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 2, p. 1777–1800, 2021.
- RASIT, N.; IDRIS, A.; GHANI, W. A. W. A. K.; HAMZAH, S. Glycerine supplementation as a recovery strategy of long - chain fatty acids inhibition on anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 7, p. 3325–3336, 2019.
- RAZAVIARANI, V.; BUCHANAN, I. D. Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: Microbial community structure dynamics and reactor performance. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 8–17, 2015.
- REIS, C. M. DOS; CAROSIA, M. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an

- anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8498–8509, 2015.
- REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; O-THONG, S. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 17, p. 6970–6979, 2013.
- RIBERA-PI, J.; BADIA-FABREGAT, M.; CALDERER, M.; POLÁŠKOVÁ, M.; SVOJITKA, J.; ROVIRA, M.; JUBANY, I.; MARTÍNEZ-LLADÓ, X. Anaerobic Membrane Bioreactor (AnMBR) for the Treatment of Cheese Whey for the Potential Recovery of Water and Energy. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.
- RICO, C.; MUÑOZ, N.; FERNÁNDEZ, J.; RICO, J. L. High-load anaerobic co-digestion of cheese whey and liquid fraction of dairy manure in a one-stage UASB process: Limits in co-substrates ratio and organic loading rate. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 794–802, 2015.
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 58, p. 406–411, 1986.
- RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 6, p. 2481–2488, 2014.
- RIVIÈRE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. **ISME Journal**, v. 3, n. 6, p. 700–714, 2009.
- RODRIGUES, C. V.; NESPECA, M. G.; SAKAMOTO, I. K.; OLIVEIRA, J. E.; VARESCHE, M. B. A.; MAINTINGUER, S. I. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 144–154, 2019.
- RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; EDUARDO DE OLIVEIRA, J.; MAINTINGUER, S. I. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils:

- Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 33, p. 14641–14651, 2016.
- ROMÃO, B. B.; SILVA, F. T. M.; COSTA, H. C. DE B.; MOREIRA, F. S.; FERREIRA, J. DE S.; BATISTA, F. R. X.; CARDOSO, V. L. Influence of heat pre-treated inoculum and pH control on the hydrogen production by microbial consortium. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, n. 1, p. 505–512, 2018.
- ROSA, P. R. F. **Produção de hidrogênio e etanol através da fermentação acidogênica de águas residuárias agroindustriais em reator anaeróbio de leito fluidizado**. Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 25, p. 13118–13127, 2014a.
- ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 10–19, 2014b.
- ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SILVA, E. L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 3, p. 1288–1296, 2014.
- ROSLAN, N. A.; ABIDIN, S. Z.; IDERIS, A.; VO, D. V. N. A review on glycerol reforming processes over Ni-based catalyst for hydrogen and syngas productions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 36, p. 18466–18489, 2020.
- ROTARU, A.-E.; SHRESTHA, P. M.; LIU, F.; SHRESTHA, M.; SHRESTHA, D.; EMBREE, M.; ZENGLER, K.; WARDMAN, C.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 1, p. 408–415, 2014a.
- ROTARU, A. E.; SHRESTHA, P. M.; LIU, F.; MARKOVAITE, B.; CHEN, S.; NEVIN, K.



- P.; LOVLEY, D. R. Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 15, p. 4599–4605, 2014b.
- SÁ, L. R. V. DE; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Quim. Nova**, v. 37, n. 5, p. 857–867, 2014.
- SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 17, p. 9000–9011, 2014.
- SARIPAN, A. F.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production by thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KKU-ED1: Culture conditions optimization using mixed xylose/arabinose as substrate. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2013.
- SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; BIHAN, Y. LE; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, 2012.
- SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, S.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 56, p. 29575–29582, 2019.
- SCHIEVANO, A.; TENCA, A.; LONATI, S.; MANZINI, E.; ADANI, F. Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass? **Applied Energy**, v. 124, p. 335–342, 2014.
- SCHIEVANO, A.; TENCA, A.; SCAGLIA, B.; MERLINO, G.; RIZZI, A.; DAFFONCHIO, D.; OBERTI, R.; ADANI, F. Two-Stage vs Single-Stage Thermophilic Anaerobic Digestion: Comparison of Energy Production and Biodegradation Efficiencies. **Environmental science & technology**, v. 46, p. 8502–8510, 2012.
- SELMA, V. C.; COTRIM, L. H. B.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. ASBR Applied to the Treatment of Biodiesel Production Effluent: Effect of Organic Load and Fill Time on Performance and Methane Production. **Applied**

- Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2365–2380, 2010.
- SILVA, A. N. DA; MACÊDO, W. V.; SAKAMOTO, I. K.; PEREYRA, D. DE L. A. D.; MENDES, C. O.; MAINTINGUER, S. I.; FILHO, R. A. C.; DAMIANOVIC, M. H. Z.; VARESCHE, M. B. A.; AMORIM, E. L. C. DE. Biohydrogen production from dairy industry wastewater in an anaerobic fluidized-bed reactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 257–264, 2019.
- SILVA, F. M. S.; MAHLER, C. F.; OLIVEIRA, L. B.; BASSIN, J. P. Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, v. 76, p. 339–349, 2018.
- SILVA, F. M. S.; OLIVEIRA, L. B.; MAHLER, C. F.; BASSIN, J. P. Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 22720–22729, 2017.
- SILVA, M. C. DE A.; MONTEGGIA, L. O.; BARROSO JÚNIOR, J. C. A.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A. Evaluation of semi-continuous operation to hydrogen and volatile fatty acids production using raw glycerol as substrate. **Renewable Energy**, v. 153, p. 701–710, 2020.
- SILVESTRE, G.; FERNÁNDEZ, B.; BONMATÍ, A. Addition of crude glycerine as strategy to balance the C/N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 377–385, 2015.
- SIMÕES, A. N. **Processamento do glicerol bruto em reatores anaeróbios de leito fluidificado, acidogênico e metanogênico, em temperatura mesofílica**. Universidade de São Paulo, 2017.
- SIMÕES, A. N.; COSTA, T. B. DA; MENEZES, C. A. DE; SILVA, E. L. One waste and two products: choosing the best operational temperature and hydraulic retention time to recover hydrogen or 1,3-propanediol from glycerol fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2021.
- SIQUEIRA, L. M. **Influência da taxa de carregamento orgânico na degradação anaeróbia da vinhaça em reator de leito fluidizado**. Universidade Federal de São Carlos, 2008.
- SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p.

13789–13796, 2012a.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15473–15482, out. 2012b.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Fermentation of hydrogen, 1,3-propanediol and ethanol from glycerol as affected by organic loading rate using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27558–27569, 2017.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Methane Production from the Co-digestion of Algal Biomass with Crude Glycerol by Anaerobic Mixed Cultures. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Valorization of crude glycerol into hydrogen, 1,3-propanediol, and ethanol in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under thermophilic conditions. **Renewable Energy**, v. 161, p. 361–372, 2020.

SOUSA, S. P.; LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Improvement of Sugarcane Stillage (Vinasse) Anaerobic Digestion with Cheese Whey as its Co-substrate: Achieving High Methane Productivity and Yield. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 3, p. 987–1006, 2019.

SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M.; NANDHINI DEVI, G. Critical considerations in two-stage anaerobic digestion of food waste – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, n. November 2019, p. 109587, 2020.

SU, X.-L.; TIAN, Q.; ZHANG, J.; YUAN, X.-Z.; SHI, X.-S.; GUO, R.-B.; QIU, Y.-L. *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2986–2991, 2014.

SUN, L.; TOYONAGA, M.; OHASHI, A.; TOURLOUSSE, D. M.; MATSUURA, N.; MENG, X. Y.; TAMAKI, H.; HANADA, S.; CRUZ, R.; YAMAGUCHI, T.; SEKIGUCHI, Y. *Lentimicrobium saccharophilum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum bacteroidetes, and proposal of lentimicrobiaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n.

- 7, p. 2635–2642, 2016.
- TAN, H. W.; ABDUL AZIZ, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118–127, 2013.
- TANGKATHITIPONG, P.; INTANOO, P.; BUTPAN, J.; CHAVADEJ, S. Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). **Renewable Energy**, v. 113, p. 1077–1085, 2017.
- TIAN, Z.; CABROL, L.; RUIZ-FILIPPI, G.; PULLAMMANAPPALLIL, P. Microbial ecology in anaerobic digestion at agitated and non-agitated conditions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- TREU, L.; TSAPEKOS, P.; PEPRAH, M.; CAMPANARO, S.; GIACOMINI, A.; CORICH, V.; KOUGIAS, P. G.; ANGELIDAKI, I. Microbial profiling during anaerobic digestion of cheese whey in reactors operated at different conditions. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 375–385, 2019.
- UEKI, A.; WATANABE, M.; OHTAKI, Y.; KAKU, N.; UEKI, K. Description of *Propionispira arcuata* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor of cattle waste, reclassification of *Zymophilus raffinosivorans* and *Zymophilus paucivorans* as *Propionispira raffinosivorans* comb. nov. and *Propionispira paucivorans* comb. . **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, p. 3571–3577, 2014.
- VÁSQUEZ, J.; NAKASAKI, K. Effects of acclimated sludge used as seeding material in the start-up of anaerobic digestion of glycerol. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 20, n. 1, p. 185–192, 2018.
- VENETSANEAS, N.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; KORAROS, M.; LYBERATOS, G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3713–3717, 2009.
- VILELA, R.; SAIA, F. T.; GREGORACCI, G. B.; DUARTE, R.; ANDRADE, P.; ZAAAN, B. VAN DER; LANGENHOFF, A.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Hydrogen production in

- reactors: The influence of organic loading rate, inoculum and support material. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 50, p. 27259–27271, 2019.
- VLASSIS, T.; STAMATELATOU, K.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: A comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 2000–2006, 2013.
- VOLPINI, V.; LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Biomethane generation in an AnSBBR treating effluent from the biohydrogen production from vinasse: Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimation. **Renewable Energy**, v. 116, p. 288–298, 2018.
- WAINAINA, S.; LUKITAWESA; AWASTHI, M. K.; TAHERZADEH, M. J. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. **Bioengineered**, v. 10, p. 437–458, 2019.
- WALKER, M.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6339–6346, 2009.
- WALTER, A.; PROBST, M.; FRANKE-WHITTLE, I. H.; EBNER, C.; PODMIRSEG, S. M.; ETEMADI-SHALAMZARI, M.; HUPFAUF, S.; INSAM, H. Microbiota in anaerobic digestion of sewage sludge with and without co-substrates. **Water and Environment Journal**, v. 33, n. 2, p. 214–222, 2019.
- WANG, Q.; XIE, N.; QIN, Y.; SHEN, N.; ZHU, J.; MI, H.; HUANG, R. *Tumebacillus flagellatus* sp. nov., an  $\alpha$ -amylase/ pullulanase-producing bacterium isolated from cassava wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3138–3142, 2013.
- WANG, R.; ZHANG, J.; LIU, J.; YU, D.; ZHONG, H.; WANG, Y.; CHEN, M.; TONG, J.; WEI, Y. Effects of chlortetracycline, Cu and their combination on the performance and microbial community dynamics in swine manure anaerobic digestion. **Journal of Environmental Sciences**, v. 67, p. 206–215, 2018.
- WANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J.; MENG, L. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 5, p. 848–

- 853, 2009.
- WATANABE, R.; TADA, C.; BABA, Y.; FUKUDA, Y.; NAKAI, Y. Enhancing methane production during the anaerobic digestion of crude glycerol using Japanese cedar charcoal. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 387–392, 2013.
- WEI, C.; ZHANG, T.; FENG, C.; WU, H.; DENG, Z.; WU, C.; LU, B. Treatment of food processing wastewater in a full-scale jet biogas internal loop anaerobic fluidized bed reactor. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 347–357, 2011.
- WU, B.; LI, Y.; LIM, W.; LEE, S. L.; GUO, Q.; FANE, A. G.; LIU, Y. Single-stage versus two-stage anaerobic fluidized bed bioreactors in treating municipal wastewater: Performance, foulant characteristics, and microbial community. **Chemosphere**, v. 171, p. 158–167, 2017.
- YAN, J. Q.; LIAO, P. H.; LO, K. V. Methane production from cheese whey. **Biomass**, v. 17, n. 3, p. 185–202, 1988.
- YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 18, p. 4761–4771, 2007.
- YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 362–367, 2008.
- YESHANEW, M. M.; FRUNZO, L.; LUONGO, V.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Start-up of an anaerobic fluidized bed reactor treating synthetic carbohydrate rich wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 184, p. 456–464, 2016.
- YI, Y.; WANG, H. Z.; CHEN, Y. T.; GOU, M.; XIA, Z. Y.; HU, B.; NIE, Y.; TANG, Y. Q. Identification of Novel Butyrate- and Acetate-Oxidizing Bacteria in Butyrate-Fed Mesophilic Anaerobic Chemostats by DNA-Based Stable Isotope Probing. **Microbial Ecology**, v. 79, n. 2, p. 285–298, 2020.
- ZAHEDI, S.; GARCÍA-MORALES, J. L.; SALES, D.; SOLERA, R. Bioenergy Generation from Municipal Solid Waste and Glycerin Waste: Population Dynamics. **Energy and Fuels**,

- v. 31, n. 9, p. 9550–9556, 2017.
- ZAHEDI, S.; RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Mesophilic anaerobic co-digestion of sewage sludge with glycerine: Effect of solids retention time. **Fuel**, v. 215, p. 285–289, 2018.
- ZAHEDI, S.; SOLERA, R.; GARCÍA-MORALES, J. L.; SALES, D. Effect of the addition of glycerol on hydrogen production from industrial municipal solid waste. **Fuel**, v. 180, p. 343–347, 2016.
- ZHANG, F.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; DAI, K.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN; ZENG, R. J. Simultaneous production of acetate and methane from glycerol by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. **Applied Energy**, v. 148, p. 326–333, 2015.
- ZHANG, Q.; WANG, M.; MA, X.; GAO, Q.; WANG, T.; SHI, X.; ZHOU, J.; ZUO, J.; YANG, Y. High variations of methanogenic microorganisms drive full-scale anaerobic digestion process. **Environment International**, v. 126, p. 543–551, 2019.
- ZHONG, J.; STEVENS, D. K.; HANSEN, C. L. Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 45, p. 15470–15476, dez. 2015.
- ZHU, Y.; YANG, S.-T. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 143–157, 2004.
- ZIGOVÁ, J.; ŠTURDÍK, E. Advances in biotechnological production of butyric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 153–160, 2000.