



**RÚBIA MARCIA SIQUEIRA MARTINS**

**ESTUDO DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E DOS  
MICRORGANISMOS DA CODIGESTÃO DO EFLUENTE DE  
LATICÍNIO COM ESTERCO BOVINO PARA A PRODUÇÃO  
DE BIOGÁS**

**Lavras-MG  
2023**

**RÚBIA MARCIA SIQUEIRA MARTINS**

**ESTUDO DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E DOS MICRORGANISMOS DA  
CODIGESTÃO DO EFLUENTE DE LATICÍNIO COM ESTERCO BOVINO PARA A  
PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dra. Cristina Ferreira Silva  
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Henrique Otênio  
Coorientador

**Lavras-MG  
2023**

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

Martins, Rúbia Marcia Siqueira.

Estudo das variáveis físico-químicas e dos microrganismos da codigestão do efluente de laticínio com esterco bovino para a produção de biogás / Rúbia Marcia Siqueira Martins. - 2023. 65 p.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva.

Coorientador(a): Dr. Marcelo Henrique Otênio

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Biogás. 2. Efluente de laticínio. 3. Esterco bovino. I. Silva, Cristina Ferreira. II. Título.

**RÚBIA MARCIA SIQUEIRA MARTINS**

**ESTUDO DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E DOS MICRORGANISMOS DA  
CODIGESTÃO DO EFLUENTE DE LATICÍNIO COM ESTERCO BOVINO PARA A  
PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

**STUDY THE PHYSICAL-CHEMICAL VARIABLES AND MICROORGANISMS OF  
THE CO-DIGESTION OF DAIRY EFFLUENT WITH CATTLE MANURE FOR  
BIOGAS PRODUCTION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de maio de 2023.

Dra. Luciana Silva Ribeiro Martins, UFLA

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila, UFLA

Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani, UFLA

Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes, UFGD

Prof. Dra. Cristina Ferreira Silva  
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Henrique Otênio  
Coorientador

**Lavras-MG  
2023**

## AGRADECIMENTOS

À experiência singular destes pouco mais de quatro anos de doutorado.

À força suprema e ordenadora, por me fazer ver além e transformar em aprendizado, os desafios desta caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Aos professores do doutorado que contribuíram para a minha formação.

À pós-doutoranda Luciana Ribeiro, pela presteza e troca de conhecimentos.

Aos técnicos e laboratorista da UFLA - Cidinha, Dirceu e Ivani, pela presteza e amizade.

Aos colegas de curso, pelos momentos agradáveis e pelos laços de amizade.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização do doutorado e pela estrutura oferecida.

À minha querida família, pelo apoio e imenso amor.

Aos meus amigos, pelo companheirismo, carinho e por tornar a caminhada mais leve.

A todos que, de certa forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

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

## RESUMO

Durante as etapas de produção da indústria de laticínios são gerados resíduos líquidos, que possuem elevada carga orgânica com alto potencial poluidor. Diante disso, a digestão anaeróbia pode ser utilizada para o tratamento deste efluente. Porém, dada a alta biodegradabilidade deste substrato, esta biotecnologia pode apresentar algumas desvantagens, devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, o que resulta na inibição das arqueias metanogênicas, levando à falha nos digestores e menor produção de biogás. A alternativa para não acidificação é a utilização do esterco bovino em codigestão com efluente de laticínio. Este trabalho teve como objetivo estudar as variáveis físico-químicas e a microbiota metanogênica da codigestão do efluente de laticínio com esterco bovino para a produção de biogás. Para isso, foram realizados ensaios de codigestão anaeróbia dos dois substratos em reatores anaeróbios de bancada, em processo de batelada, com a reutilização do lodo das alimentações anteriores, e foram avaliados o efeito sinérgico do efluente de laticínio com o esterco bovino, o potencial de adaptação do lodo ao efluente, a caracterização dos microrganismos predominantes e quantificação dos carboidratos consumidos e ácidos orgânicos produzidos. A mistura do efluente de laticínio e esterco bovino não apresentou alcalinidade adequada para o desenvolvimento do consórcio metanogênico, porém o sistema demonstrou capacidade inerente em adquirir alcalinidade ao longo do tempo, apresentando maior equilíbrio do processo. Apesar da obtenção dos valores de alcalinidade total e pH para a estabilidade da codigestão anaeróbia, houve baixa produção de biogás, indicando a necessidade de maior tempo de adaptação dos microrganismos do esterco bovino ao efluente de laticínio para uma melhor atividade metanogênica.

Palavras-chave: Biogás. Efluente de laticínio. Esterco bovino. Microrganismos metanogênicos.

## ABSTRACT

During the production stages of the dairy industry, liquid waste is generated with a high organic load considered potentially polluting. Therefore, anaerobic digestion can be an alternative to treat this effluent. However, given the high biodegradability of this substrate, this biotechnology may have some disadvantages. It accumulates organic acids, resulting in the inhibition of methanogenic archaea, and leading to digester failure and lower biogas production. A solution for non-acidification is using cattle manure in co-digestion with dairy effluent. This work aimed to study the physical-chemical variables and the methanogenic microbiota of the co-digestion of dairy effluent with cattle manure for biogas production. For this, anaerobic co-digestion tests were carried out on the two substrates in benchtop anaerobic reactors, in a batch process, with the reuse of sludge from the previous feeding. The synergistic effect of dairy effluent with cattle manure, the potential of adaptation of sludge to effluent, the characterization of predominant microorganisms, and the quantification of consumed carbohydrates and produced organic acids were evaluated. The dairy effluent mixture and cattle manure did not show adequate alkalinity for the methanogenic consortium development. However, the system showed an inherent capacity to acquire alkalinity over time, presenting a greater balance in the process. Despite obtaining total alkalinity and pH values for the stability of anaerobic co-digestion, there was a low -production of biogas, indicating the need for a longer period of adaptation of microorganisms from cattle manure to dairy effluent for better methanogenic activity.

**Keywords:** Biogas. Dairy effluent. Cattle manure. Methanogenic microorganisms.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das principais etapas do processo de digestão anaeróbia. Chernicharo (2016). .....	18
Figura 2 - Representação do biodigestor Indiano. Deganutti et al. (2002).....	21
Figura 3 - Representação do biodigestor Chinês. Deganutti et al. (2002).....	21
Figura 4 – Representação do reator UASB. Chernicharo (2016).....	22
Figura 5 - Representação do reator contínuo de mistura completa (CSTR). Souza et al. (2014). .....	23
Figura 6 - Representação do biodigestor de lagoa coberta anaeróbia. Barreira (2017).....	24
Figura 7 - Reatores anaeróbios de bancada contendo a mistura de efluente de laticínio e esterco bovino a 50%. A – Reator acoplado diretamente a seringa de vidro para medição do biogás total. B – Reator acoplado ao frasco com solução de hidróxido de sódio para a medição do metano. ....	30
Figura 8 - pH da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da primeira e segunda alimentação. A – Primeira alimentação. B – Segunda alimentação. ....	41
Figura 9 - Produção acumulada de metano da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da primeira e segunda alimentação. A – Primeira alimentação. B- Segunda alimentação. ....	44
Figura 10 - pH e produção acumulada de metano da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da terceira alimentação. A – pH. B – Produção acumulada de metano. ....	46
Figura 11 - Rendimento de metano das codigestões anaeróbias do efluente de laticínios e esterco bovino e da digestão anaeróbia do efluente de laticínio. A - Codigestão anaeróbia do efluente de laticínio e estrume bovino (1ª e 2ª alimentação) e digestão anaeróbia do efluente de laticínio (3ª alimentação). B – Codigestão anaeróbia do efluente de laticínio e estrume bovino, com hidróxido de sódio (1ª e 2ª alimentação) e digestão anaeróbia do efluente de laticínio, com hidróxido de sódio (3ª alimentação). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância.....	48



Figura 12 - Consumo de carboidratos e produção de ácidos orgânicos e etanol da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios e esterco bovino, com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da segunda alimentação. A – Carboidratos. B – Ácidos orgânicos. C- Etanol.....49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesos dos lodos obtidos da primeira alimentação e volume do substrato a adicionar na segunda alimentação .....	32
Tabela 2 - Pesos dos lodos obtidos da primeira e segunda alimentação e volume do substrato a adicionar na terceira alimentação .....	32
Tabela 3 - Pesos dos lodos obtidos da primeira, segunda e terceira alimentação .....	32
Tabela 4 - Composição do meio de cultura de soro de queijo ácido (ACW) para isolamento de microrganismos presentes na codigestão do efluente de laticínios e esterco bovino .....	35
Tabela 5 - Caracterização físico-química do efluente de laticínio utilizado nas três alimentações dos reatores anaeróbios.....	37
Tabela 6 - Caracterização físico-química do esterco bovino diluído (1:1) utilizado nas duas alimentações dos reatores anaeróbios.....	37
Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais da digestão anaeróbia do esterco bovino e das codigestões anaeróbias do efluente de laticínio e esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, da primeira alimentação (0-30 dias) .....	39
Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais da digestão anaeróbia do esterco bovino e das codigestões anaeróbias do efluente de laticínios e esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, da segunda alimentação (31- 60 dias).....	40
Tabela 9 - Incremento de pH e alcalinidade total (AT), remoção de sólidos voláteis (SV) e rendimento de biogás e de metano da digestão anaeróbia do esterco bovino e das codigestões anaeróbias do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, da primeira e segunda alimentação. Médias com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância .....	42
Tabela 10 - pH dos lodos resultantes da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio da primeira e segunda alimentação, e da digestão dos efluentes de laticínio, sem e com hidróxido de sódio, da terceira alimentação.....	43
Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais da digestão anaeróbia do lodo do esterco bovino e das digestões anaeróbias do efluente de laticínio, sem e com hidróxido de sódio, da terceira alimentação (61-90 dias) .....	45
Tabela 12 - Incremento de pH e alcalinidade total (AT), remoção de sólidos voláteis (SV) e rendimento de biogás e metano da digestão anaeróbia do efluente de laticínios, sem e com	

hidróxido de sódio, da terceira alimentação. Médias com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância .....	47
Tabela 13 - Caracterização físico-química do lodo obtido ao final da terceira alimentação da digestão do esterco bovino, das codigestões do efluente de laticínio e estrume bovino, sem e com hidróxido de sódio, e das digestões do efluente de laticínio sem e com hidróxido de sódio .....	48
Tabela 14 - Comparação energética de algumas reações comuns na degradação anaeróbia ...	51
Tabela 15 - Carboidratos, etanol e ácidos orgânicos presentes no soro de queijo ácido, utilizado como meio de cultura .....	53
Tabela 16 - Gêneros e espécies de bactérias identificadas ao longo dos 30 dias de incubação da digestão do esterco bovino e das codigestões sem e com adição de hidróxido de sódio, da segunda alimentação.....	54

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Efluentes da produção de laticínios .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Digestão anaeróbia para produção de biogás .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.1 Fundamentos da digestão anaeróbia .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Os biodigestores .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.3 Parâmetros de importância da produção de biogás .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Produção de biogás de resíduos orgânicos .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Estudos para produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia do soro de queijo e esterco bovino.....</b>	<b>28</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Primeira etapa: Estudo do perfil de equilíbrio da codigestão do efluente de laticínio com esterco bovino e do potencial de adaptação do lodo resultante.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.1 Quantificação do volume do biogás e do metano.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.2 Determinação do pH, alcalinidade total (AT), sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV) .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Segunda etapa: Caracterização dos microrganismos e quantificação dos carboidratos, ácidos orgânicos e etanol do processo de codigestão anaeróbia .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1 Cultivo e isolamento dos microrganismos da codigestão anaeróbia, em meio de cultura alternativo, composto de soro de queijo.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1.1 Preparo do meio de cultura .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1.2 Isolamento dos microrganismos da codigestão do efluente de laticínio e esterco bovino.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.1.3 Identificação dos microrganismos isolados .....</b>	<b>35</b>

<b>4.2.2</b>	<b>Quantificação dos carboidratos e ácidos orgânicos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização físico-química do efluente de laticínio e do esterco bovino .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Desempenho da codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com esterco bovino ...</b>	<b>38</b>
<b>5.3</b>	<b>Potencial de adaptação do lodo ao efluente de laticínio, visando seu uso como inóculo para partida da digestão anaeróbia .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4</b>	<b>Consumo de carboidratos e produção de ácidos orgânicos e etanol da codigestão anaeróbia do efluente de laticínio e esterco bovino, com hidróxido de sódio.....</b>	<b>49</b>
<b>5.5</b>	<b>Cultivo e isolamento dos microrganismos acidogênicos, em meio de cultura alternativo, composto de soro de queijo .....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O setor laticinista desempenha um papel de grande importância para a economia nacional, e o Brasil encontra-se entre os cinco maiores produtores de queijo do mundo, apresentando uma produção média de um milhão de toneladas de queijo por ano (EMBRAPA, 2023). Minas Gerais, conhecido pela qualidade dos seus queijos artesanais e industriais, se destaca como o maior produtor de queijos do país, sendo responsável por 25% da produção nacional (IBGE, 2023; EMBRAPA, 2023).

Durante todas as etapas de produção da indústria de laticínios, são gerados resíduos líquidos, oriundos do tratamento térmico do leite e da fabricação de queijos, requeijão, iogurte, doce de leite e manteiga (PATTNAIK et al., 2007; FEAM, 2011). Este efluente, constituído principalmente por lipídeos, proteínas, carboidratos, sais minerais, detergentes e desinfetantes, possui elevada carga orgânica e alto poder de poluição ambiental, se lançado continuamente nos corpos receptores sem o devido tratamento (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; CHARALAMBOUS et al., 2020).

A digestão anaeróbia, que é mediada pela interação de um consórcio de microrganismos, pode ser utilizada para o tratamento de efluentes da indústria de laticínios, que além de reduzir a carga orgânica, gera energia renovável. Porém, dada a alta biodegradabilidade deste substrato, esta biotecnologia pode apresentar algumas desvantagens, devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, durante a acidogênese, o que resulta na queda do pH e na inibição das arqueias metanogênicas, levando à falha nos digestores e conseqüentemente, menor produção de biogás (ESCALANTE et al., 2018; CHARALAMBOUS; VYRIDES, 2021).

Encontra-se na literatura trabalhos que utilizam o soro de queijo - o qual também apresenta alta biodegradabilidade, em codigestão com o estrume bovino, porém ainda são escassos os estudos que utilizam como co-substrato o efluente de laticínio. O esterco bovino, além de ser fonte de microrganismos metanogênicos, atua no equilíbrio do sistema, dada a sua maior alcalinidade e quantidade desejável de material de difícil degradação, como a lignocelulose, o que garante o tamponamento do processo e maior taxa de produção de metano (LI; PARK; ZHU, 2011; ADU-GYAMFI; RAVELLA; HOBBS, 2012; HAGEM et al, 2014; RICO; MUÑOZ E RICO, 2015; ESCALANTE et al., 2018). Devido a isso, a codigestão do efluente de laticínio com o esterco bovino, pode apresentar-se como uma alternativa viável para a supressão da desvantagem relacionada a característica ácida deste substrato, e o estudo dos microrganismos envolvidos no processo, torna-se necessário para o conhecimento da dinâmica

da produção de biogás, e assim, para o desenvolvimento de estratégias de controle dos parâmetros operacionais e otimização da produção de metano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar as variáveis físico-químicas e a microbiologia da codigestão do efluente de laticínio com esterco bovino para a produção de biogás.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito sinérgico do efluente de laticínio com o esterco bovino, na proporção de 50% de cada substrato, sem e com suplementação de hidróxido de sódio, para a produção de biogás.
- Estudar a dinâmica do consumo de substratos e produção de metabólitos pelo consórcio metanogênico.
- Caracterizar os microrganismos acidogênicos do processo de codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com o esterco bovino.
- Avaliar o potencial de adaptação do lodo oriundo da codigestão anaeróbia, ao efluente de laticínio, a partir de sua reutilização como inóculo para partida do reator, no processo de batelada.

## **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 Efluentes da produção de laticínios**

A indústria de laticínios caracteriza-se pela produção de produtos lácteos como, queijos, requeijão, iogurte, doce de leite, manteiga e de leites tratados termicamente, e durante todo o processo produtivo são gerados efluentes líquidos em grande volume e com elevada carga orgânica, que possuem variação em suas características e em sua quantidade, de acordo com o tipo de produto fabricado (FEAM, 2011; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013).

Segundo a *European Commission – Integrated Pollution Prevention and Control Jan/2006* apud Maganha (2008), os efluentes da produção de laticínios podem ser divididos em três grupos: os provindos do processamento de produtos brancos, como o leite, cremes e iogurtes, que geram uma taxa de efluente média de 3 litros por quilo de leite utilizado, os produtos amarelos, como a manteiga e os queijos, que geram 4 litros por quilo de leite, e os produtos classificados como especiais, que são os concentrados de leite ou de soro e os produtos lácteos desidratados, que produzem 5 litros de efluentes por quilo do leite empregado.

Estes efluentes são constituídos basicamente pelos componentes do leite e dos produtos lácteos, como carboidratos, proteínas, lipídeos, sais minerais, bactérias lácticas, e, também pelos resíduos das substâncias químicas empregadas na limpeza em geral (PATTNAIK et al., 2007; FEAM, 2011).

O tratamento dos efluentes orgânicos industriais, como os de laticínios, geralmente é realizado por processo biológico, e contempla basicamente três etapas - a primeira, constitui-se do tratamento preliminar para a remoção de partículas maiores por sistema de peneiramento. Após isso, realiza-se o tratamento secundário, onde ocorre a neutralização e homogeneização dos despejos em um tanque equalizador, eliminando as flutuações de vazão, e, então, finalmente é realizado o tratamento microbiológico, que pode ser aeróbio, anaeróbio ou a combinação de ambos, e, é o responsável pela redução da carga orgânica em níveis aceitáveis pela legislação ambiental, para o lançamento em corpos receptores (FIEMG, 2014).

Atualmente, a digestão anaeróbia vem tornando-se uma alternativa atraente para a indústria de laticínios, pois além de ser uma forma de tratamento eficiente na remoção da alta carga orgânica do efluente, produz o biogás, constituído principalmente de metano e dióxido de carbono, que pode ser captado com a utilização de tecnologias de biorreatores, e utilizada como energia térmica, em substituição a lenha, para geração de vapor nas caldeiras, ou em motogeradores, após a remoção da umidade e do gás sulfídrico contidos no biogás (FIEMG, 2014; FEAM; GIZ; FIEMG, 2015).

## **3.2 Digestão anaeróbia para produção de biogás**

### **3.2.1 Fundamentos da digestão anaeróbia**

Acredita-se que o biogás ou gás dos pântanos, como era chamado naquela época, foi descoberto pelo cientista Thomas Shirley em 1667, no Reino Unido. No entanto, foi apenas em 1776, que o químico Italiano Alessandro Volta identificou o metano no gás dos pântanos,



resultante da decomposição de restos vegetais em ambientes confinados (MOTTA, 1986; NOGUEIRA, 1986).

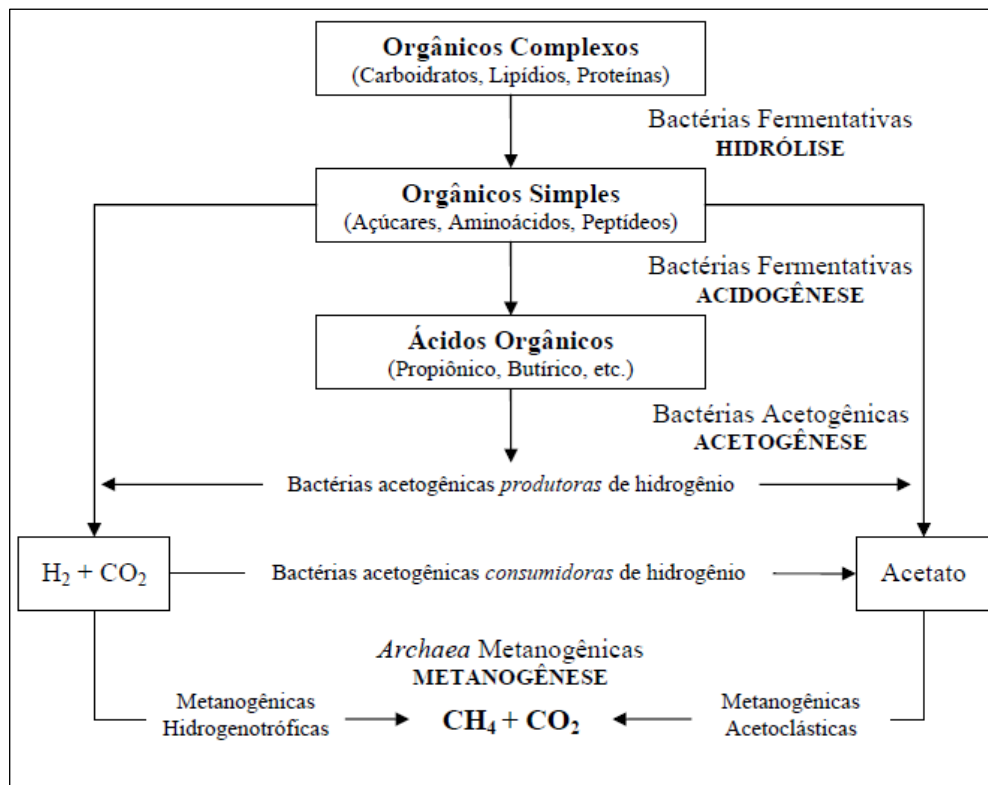
Na Inglaterra, em 1806, Humphrey Davy constatou um gás rico em metano e dióxido de carbono, resultante da decomposição de dejetos de animais em lugares úmidos. Em 1884, Ulysse Gayon, aluno de Louis Pasteur, realizou a fermentação anaeróbia de uma mistura de esterco e água a 35° C, conseguindo obter 100 litros de gás por metro cúbico de matéria, e ao apresentar à Academia das Ciências, as pesquisas e experiências do seu aluno, Louis Pasteur considerou que essa fermentação poderia constituir uma fonte de aquecimento e iluminação (MOTTA, 1986; NOGUEIRA, 1986).

Contudo, a ideia de aproveitar o gás metano já era realidade na Índia. Em 1857 foi construída em Bombaim, a primeira instalação operacional destinada a produzir gás combustível para atender um hospital de hansenianos (NOGUEIRA, 1986). Nesta época, pesquisadores como Fisher e Schrader, na Alemanha, e Gayon, na França, estabeleceram as bases teóricas e experimentais da biodigestão anaeróbia (CAMPOS, 1981).

A biodigestão anaeróbia é o processo biológico no qual a matéria orgânica é degradada na ausência de oxigênio e se converte numa mistura de metano, dióxido de carbono e pequenas quantidades de hidrogênio, nitrogênio e sulfeto de hidrogênio. Essa mistura que apresenta concentração de metano entre 55% a 70% é chamada de biogás e pode ser utilizada como combustível (NOGUEIRA, 1986; LI et al., 2011).

A digestão anaeróbia é realizada por um consórcio de microrganismos em um processo complexo, envolvendo um grande número de espécies de bactérias e arqueobactérias que atuam de forma simbiótica. As reações bioquímicas principais que ocorrem no processo podem ser divididas em quatro etapas, chamadas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 1) (RAO; BARAL, 2012; CHERNICHARO, 2019).

Figura 1 - Esquema das principais etapas do processo de digestão anaeróbia



Fonte: Chernicharo (2016).

A hidrólise é a primeira etapa na degradação anaeróbia de polímeros complexos, como carboidratos, proteínas e lipídeos. A hidrólise do material particulado e do material solúvel de maior tamanho é uma etapa essencial para aumentar a biodisponibilidade dos mesmos às células microbianas. O material orgânico é convertido em compostos de menor peso molecular por meio de enzimas excretadas pelas bactérias hidrolíticas. As proteínas são degradadas em peptídeos, os carboidratos em açúcares solúveis e os lipídios em ácidos graxos de cadeia longa e glicerol (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Entre os gêneros de bactérias hidrolíticas que são encontradas no processo de digestão anaeróbia estão os produtores de lipases, que atuam na degradação de lipídeos a ácidos graxos, como, *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, os gêneros produtores de proteases para degradação de proteínas a aminoácidos, como os *Bacteroides*, *Butyvirbio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Peptococcus* e *Bacillus*, e os produtores

de amilases para degradação de polissacarídeos a açúcares menores, que são os *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Acetivibrio*, *Eubacterium* (ANDERSON et al., 2003).

Na acidogênese, os produtos gerados no processo de hidrólise são absorvidos e metabolizados pelas bactérias acidogênicas, que produzem substâncias como ácidos graxos voláteis de cadeia curta, álcoois, ácido lático e compostos inorgânicos como, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>S. A maioria de espécies de bactérias que realizam acidogênese são anaeróbias obrigatórias, entretanto, algumas espécies são facultativas e podem metabolizar a matéria orgânica por via oxidativa, utilizando oxigênio comoceptor de elétrons, removendo resíduos de oxigênio dissolvido no sistema e, dessa forma, eliminando qualquer efeito tóxico aos microrganismos estritamente anaeróbios, entre eles, as arqueias metanogênicas. Os gêneros de bactérias acidogênicas comumente encontrados em reatores anaeróbios são *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* (ARCHER; KIRSOP, 1990; ANDERSON et al., 2003; CHERNICHARO, 2019).

Na etapa de acetogênese, dois grupos de acetogênicas podem ser distinguidos, baseados em seus metabolismos:

O primeiro grupo é formado pelas bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio obrigatórias, as quais produzem ácido acético, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> a partir de uma grande variedade de substratos, e entre eles estão os ácidos graxos intermediários - propionato e butirato, álcoois e outros ácidos orgânicos de cadeia longa, como valerato, lactato e palmitato (AQUINO; CHERNICHARO, 2005; CHERNICHARO, 2019).

Baseada nas leis da termodinâmica, especificamente da energia livre ( $\Delta G$ ), resultante da oxidação dos ácidos graxos, as acetogênicas produtoras de hidrogênio são capazes de crescer apenas em ambientes sob baixas pressões desse elemento. Esta condição é alcançada pela presença de microrganismos consumidores de hidrogênio no sistema, como arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e bactérias redutoras de sulfato (BRS), que vivem em relação de simbiose com as acetogênicas produtoras de hidrogênio, garantindo assim, o equilíbrio no desempenho da digestão anaeróbia (AQUINO; CHERNICHARO, 2005; CHERNICHARO, 2019).

A concentração do hidrogênio em ambientes metanogênicos é baixa o suficiente para estimular o crescimento de bactérias acetogênicas, evitando-se o acúmulo de ácidos. Entre os gêneros de bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio isolados de biorreatores anaeróbios encontra-se os *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas* (AQUINO; CHERNICHARO, 2005; CHERNICHARO, 2019).

O segundo grupo das acetogênicas é formado por bactérias estritamente anaeróbias, que produzem acetato a partir de dióxido de carbono e hidrogênio. Contribuem para a manutenção de um ambiente com baixa pressão de H<sub>2</sub> e suas atividades metabólicas independem de relações sintróficas. Os gêneros mais encontrados são: *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Butribacterium*, *Clostridium* e *Pelobacter* (ARCHER; KIRSOP, 1990; METCALF; EDDY, 2002; CHERNICHARO, 2019).

Na metanogênese, as arqueias produzem metano por duas vias metabólicas principais. As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, como as dos gêneros *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter*, reduzem o CO<sub>2</sub> a metano, utilizando H<sub>2</sub> como doador de elétrons e liberando H<sub>2</sub>O, e as arqueias acetoclásticas, como as do gênero *Methanosarcina* e *Methanosaeta* produzem o metano e CO<sub>2</sub> a partir da redução do acetato. Estas últimas possuem grande importância na digestão anaeróbia, pois produzem cerca de 70% do metano do sistema. (JETTEN et al., 1992; YU; LEE; HWANG, 2005; AQUINO et al., 2007; CHERNICHARO, 2019).

### 3.2.2 Os biodigestores

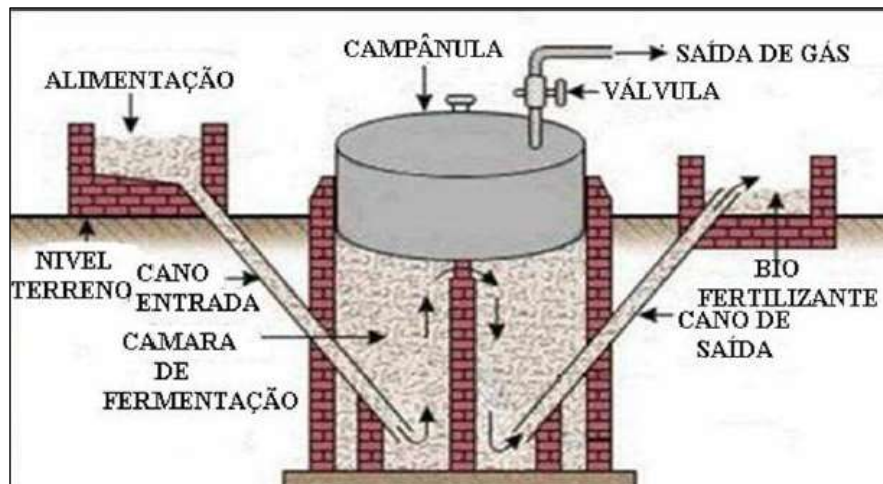
A digestão anaeróbia da matéria orgânica com o objetivo da utilização do biogás como fonte energética é realizada em biorreatores que apresentam diversos modelos e arranjos. Esses biodigestores constituem-se de uma câmara fechada hermeticamente, com sistema de captação do biogás e do efluente final, e são caracterizados pelo regime de alimentação - de forma contínua ou em batelada, pela forma de alimentação, que pode ser ascendente ou laminar, pela concentração de sólidos do substrato, e ainda pelo sistema de agitação, o que garante a mistura parcial ou completa do material a ser digerido (QUADROS et al., 2010; KUNZ et al., 2019).

Os primeiros tipos de reatores construídos foram os modelos indiano e o chinês, os quais, ainda, são amplamente utilizados. O biodigestor Indiano (Figura 2) constitui-se de um cilindro vertical construído em alvenaria, dividido em duas câmaras e possui uma campânula móvel, de aço, que funciona como gasômetro, a qual fica mergulhada sobre o lodo em digestão (DEGANUTTI et al., 2002; OLIVEIRA, 2012).

Em uma das câmaras está conectado o tubo de entrada da biomassa, e na outra, o de saída do efluente. Quando o biogás é produzido, mas não é retirado do sistema, a campânula expande-se, aumentando o volume destinado para o armazenamento do biogás, garantindo, assim, que a pressão não seja alterada. (DEGANUTTI et al., 2002; OLIVEIRA, 2012). Uma alternativa aplicada no Brasil é a construção da campânula flutuante de fibra de vidro, que

possui menor custo, comparado a campânula metálica, e é geralmente utilizada para a digestão contínua de dejetos suínos e bovinos (DEGANUTTI et al., 2002).

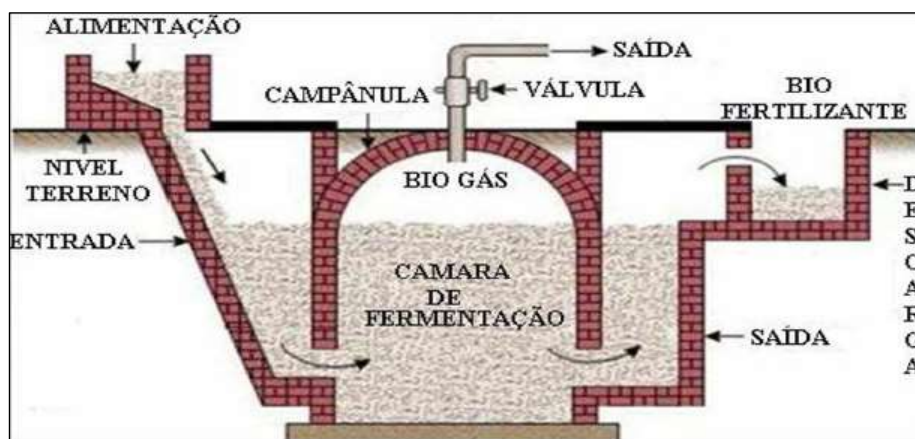
Figura 2 - Representação do biodigestor Indiano



Fonte: Deganutti et al. (2002).

O modelo Chinês (Figura 3) é constituído de uma câmara de alvenaria, possui teto em forma de abóboda, é totalmente enterrado no solo, e não possui gasômetro de aço, o que reduz o custo da sua implantação quando comparado ao indiano (NISHIMURA, 2009). Alguns dos inconvenientes do biodigestor chinês são a possibilidade de vazamento do biogás, caso o teto não esteja bem vedado e impermeabilizado, e a ausência de um dispositivo de descarga automática, o que dificulta o seu manuseio, não sendo, portanto, indicado para instalações de grande porte (DEGANUTTI et al., 2002).

Figura 3 - Representação do biodigestor Chinês

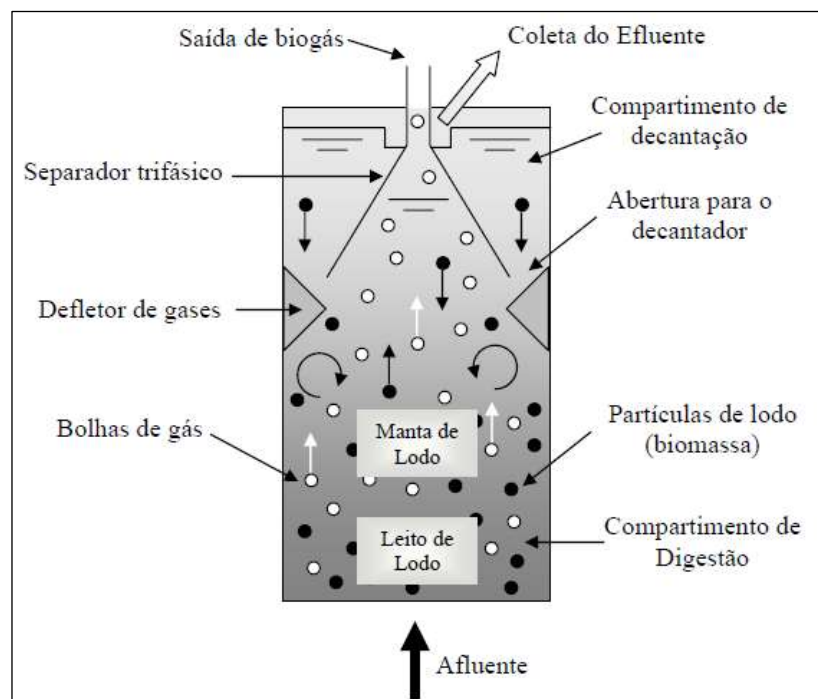


Fonte: Deganutti et al. (2002).

Atualmente, encontram-se no mercado modelos com configurações mais avançadas, como os reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) desenvolvido por Lettinga et al. (1980), e os reatores contínuos de mistura completa (CSTR) (METCALF; EDDY, 2002; GIZ; FEAM; FIEMG, 2015; SPERLING, 2016; CHERNICHARO, 2019).

O reator UASB (Figura 4) possui mecanismos de retenção de sólidos, baixo tempo de detenção hidráulica, e é capaz de suportar altas cargas volumétricas, além de ser compacto e apresentar boa eficiência na remoção da carga orgânica dos efluentes. A parte superior do reator é dividida em zona de sedimentação e zona de coleta de gás. A zona de sedimentação permite a saída do efluente clarificado e o retorno da biomassa ao sistema. O lodo da parte inferior do sistema é muito denso e de elevada capacidade de sedimentação e, na altura mediana, forma-se uma manta de lodo mais dispersa e leve. Esta biomassa pode se apresentar na forma de flocos ou de grânulos, em que há a presença dos diversos tipos de bactérias consorciadas, formando um complexo microbiológico eficiente na digestão da matéria orgânica e na produção de biogás (METCALF; EDDY, 2002; SPERLING, 2016; CHERNICHARO, 2019).

Figura 4 – Representação do reator UASB

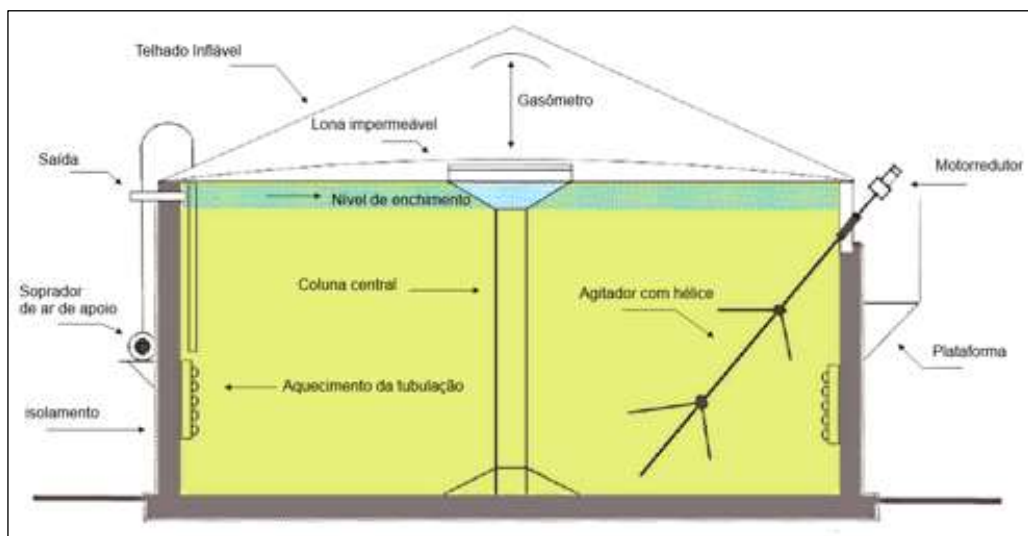


Fonte: Chernicharo (2016).

O reator CSTR (Figura 5), utilizado principalmente para a digestão de substratos mais densos, constitui-se de um reservatório cilíndrico vedado hermeticamente, comum fundo de

concreto e paredes construídas com materiais variáveis, tais como, o aço carbono, aço inox, aço vitrificado ou concreto armado. Para a garantia da estanqueidade do sistema são adotados tetos de membrana e de concreto. Possui um sistema de agitação mecânica, o qual propicia uma maior homogeneização do substrato em todo reator e melhor acesso da matéria orgânica pelos microrganismos anaeróbios, garantindo assim uma maior produtividade de biogás (FEAM; GIZ; FIEMG, 2015).

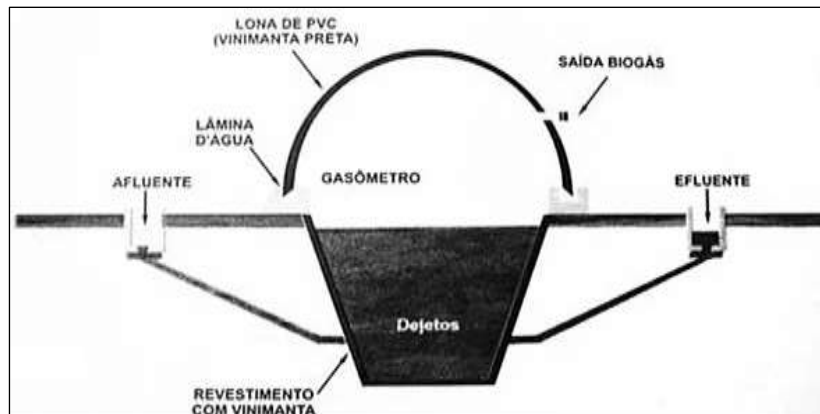
Figura 5 - Representação do reator contínuo de mistura completa (CSTR)



Fonte: Souza et al. (2014).

No Brasil, o modelo de biodigestor mais utilizado é o de lagoa coberta anaeróbia (Figura 6), devido aos seus menores custos e facilidade de implantação. Constituído de lona vinílica em substituição às campânulas, é um modelo tipo horizontal, com sentido de fluxo tubular e com a largura maior que a profundidade, obtendo com isso, uma grande área de exposição ao sol, que em climas quentes contribui para a elevação da temperatura. É indicado para grandes volumes de dejetos, porém apresenta vida útil mais curta, em média de cinco anos, e são mais sensíveis as variações térmicas, comparado aos modelos Indiano e Chinês (OLIVEIRA, 2006; KUNZ et al., 2019).

Figura 6 - Representação do biodigestor de lagoa coberta anaeróbia



Fonte: Barreira (2017).

### 3.2.3 Parâmetros de importância da produção de biogás

O processo de digestão anaeróbia, pela sua complexa interação entre as diversas espécies envolvidas, deve estar em equilíbrio para manter a estabilidade da redução da carga orgânica do efluente e produção do biogás. Os parâmetros que mais afetam o equilíbrio das comunidades microbianas são temperatura, pH, nutrientes, presença de materiais tóxicos, partida do reator e tempo de retenção hidráulica. (METCALF; EDDY, 2002; ZAHER et al., 2007; CHERNICHARO, 2019; KUNZ et al., 2019).

A temperatura influencia diretamente a velocidade das reações no biorreator, afetando a atividade metabólica dos microrganismos e influenciando o equilíbrio iônico e a solubilidade dos substratos a serem degradados (METCALF; EDDY, 2002). Segundo Dennis e Burke (2001), variações da temperatura ocasionadas pela sazonalidade e oscilações entre as temperaturas diurnas e noturnas, afetam o processo de degradação anaeróbia e, consequentemente, a quantidade de biogás produzido.

A digestão anaeróbia dos resíduos orgânicos pode ocorrer em temperaturas nas faixas mesofílica (em torno de 35°C) e termofílica (em torno de 55°C). O processo apresenta maior estabilidade nos seus parâmetros de controle, quando operado na faixa mesofílica, porém, temperaturas termofílicas são utilizadas por apresentarem maiores taxas de conversão da matéria orgânica em menor tempo, por permitir a destruição de microrganismos patogênicos e a melhor degradação de polímeros complexos (KUNZ; SAQIB, 2016; KUNZ et al., 2019).

Para o crescimento das arqueias produtoras de metano e obtenção da estabilidade do sistema, sugere-se um pH com variação entre 6,0 a 8,0 (WARD et al., 2008; RAPOSO et al.,



2012; CHERNICHARO, 2019), porém, deve-se levar em conta que a faixa de pH ótima é variável para as diferentes populações que participam do processo anaeróbio. As arqueias metanogênicas possuem uma faixa ótima de atuação entre 6,6 a 7,4, em condições fora dessa faixa, ocorre o decréscimo da produção de metano. As bactérias produtoras de ácidos possuem crescimento ótimo em pH entre 5,0 e 6,0, sendo mais tolerantes a valores de pH mais baixos do que as arqueias metanogênicas (CHERNICHARO, 2019).

De acordo com Zaher et al. (2007), na digestão anaeróbia, o pH está intimamente ligado a concentrações de ácidos orgânicos voláteis no meio, resultante do equilíbrio entre as populações de microrganismos. Assim, a queda do pH pode indicar o acúmulo de ácido no sistema e, conseqüentemente, a instabilidade do digestor. O processo de digestão também está relacionado à disponibilidade de nutrientes essenciais em concentrações apropriadas, o que influenciará no desempenho dos microrganismos, quanto a metabolização dos compostos orgânicos e na produção do biogás (KUNZ et al., 2019).

A presença de metais pesados em concentrações elevadas é frequentemente identificada como causa de falha de digestores anaeróbios. Os metais pesados, quando em concentrações elevadas podem provocar a inativação das enzimas e interrupção da atividade microbiana. Os sais minerais, assim como os metais pesados, quando em baixas concentrações, estimulam o crescimento microbiano, porém tornam-se inibidores em maiores concentrações. Outros componentes que também podem causar o desequilíbrio do sistema anaeróbio são os detergentes, antibióticos e os solventes orgânicos (ZAHER et al. 2007; APPELS et al., 2008).

A partida de digestores anaeróbios é a etapa inicial, e muitas vezes marcada por instabilidades operacionais, pois se trata da fase de adaptação dos microrganismos ao substrato. Após esse tempo de adaptação dos microrganismos, a estabilidade do processo é obtida, e inicia-se a produção de biogás (KARLSSON et al., 2014; CHERNICHARO, 2019).

Segundo Chernicharo (2019), a partida dos digestores anaeróbios pode ser realizada utilizando inóculo já adaptado ao substrato, o qual é provindo de sistema similar, obtendo-se uma partida rápida e satisfatória. Pode também ser realizada a partir de inóculo não adaptado, o que demanda um tempo de adaptação dos microrganismos ao novo ambiente, ou ainda, pode ser realizada sem a utilização de inóculo, ou seja, a produção de biogás é realizada pelos microrganismos do próprio substrato. Porém, se a concentração de microrganismos metanogênicos do substrato a ser tratado for muito baixa, o tempo para a retenção e seleção de uma elevada massa microbiana pode ser muito prolongada, o que torna essa forma de partida, a mais desfavorável.

O tempo de retenção hidráulica é o período necessário para o substrato ser digerido, obtendo-se a máxima produção de biogás, e, é considerado um dos parâmetros mais importantes para o dimensionamento de reatores. Seu valor dependerá do tipo de substrato, da configuração do biodigestor e das condições operacionais. A eficiência do processo é dada pela máxima produção de biogás, atrelada ao tempo e a taxa de decomposição do composto. Em uma unidade alimentada de forma contínua, o tempo de retenção representa o período médio da vazão do efluente no interior do biodigestor (KUNZ et al., 2019).

O biogás captado nos biorreatores anaeróbios é composto por uma mistura dos gases metano (40-75%), dióxido de carbono (20-45%) e outros gases como, o nitrogênio, oxigênio, sulfeto de hidrogênio, amônia, e monóxido de carbono, em menores quantidades, e constitui uma fonte de energia alternativa, estando seu potencial energético relacionado a quantidade de gás metano contida em sua mistura (BUDZANOWSKI, 2012; ANGELIDAKI et al., 2018; SU; HONG, 2020).

De acordo com Beil e Beyrich, (2013), entre os principais contaminantes que afetam o potencial energético do biogás, destacam-se o sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), o dióxido de carbono ( $CO_2$ ), e amônia ( $NH_3$ ). Dependendo da composição do substrato utilizado na digestão anaeróbia, o biogás bruto produzido poderá apresentar concentrações de  $H_2S$  que variam entre 100 e 10.000 ppm ( $mg\ m^{-3}$ ), podendo chegar até 30.000 ppm, em casos extremos.

Garcia-Arriaga et al. (2010) relatam que o sulfeto de hidrogênio contribui no potencial energético do biogás, porém causa corrosão nos tanques de armazenamento, tubulações metálicas e motores de combustão, resultando na deterioração da infraestrutura de produção do biogás.

Segundo Wellinger et al. (2013) a amônia apresenta propriedades corrosivas e tóxicas, e é também, outro contaminante bastante comum no biogás, originado a partir de resíduos agrícolas e presente em concentrações que variam entre 50 a 100  $mg.m^{-3}$ . Ainda, de acordo com Wellinger et al. (2013) apesar do dióxido de carbono não apresentar propriedades corrosivas, é considerado um interferente direto do potencial energético do biogás, por ser inerte em termos de combustão e ocupar volume.

Além da mistura de gases, o biogás também apresenta água em sua composição, em concentrações médias de 6%, a 40°C, que pode acumular nos dutos, via processos de condensação, resultando em problemas de corrosão e entupimento em caso de congelamento (WELLINGER et al., 2013). Nesse contexto, Kunz et al. (2019), enfatizam a necessidade da implantação de tecnologias de tratamento do biogás para a geração de um combustível de qualidade que possa ser eficientemente convertido em energia térmica, elétrica e mecânica.

### 3.3 Produção de biogás de resíduos orgânicos

Com uma taxa de crescimento de 12,8% ao ano, no período de 1990 a 2015, o biogás apresentou-se como a terceira fonte de energia renovável mais utilizada no mundo, ficando atrás apenas da energia solar fotovoltaica e da eólica. Os Estados Unidos e Europa são majoritários na produção de biogás e regiões como Ásia e África apresentam um crescimento significativo dessa fonte de energia. Nos Estados Unidos a produção de biogás, provém predominantemente dos aterros sanitários e na Europa destaca-se a produção do biogás a partir de resíduos agropecuários e culturas energéticas (REN21, 2017).

Na Europa, o número de plantas de biogás obteve um crescimento de 6 mil para aproximadamente 18 mil entre 2009 e 2017 (EBA, 2018). A Alemanha como pioneira na mudança de fonte energética possui significativa produção de biogás, com o registro de 10.800 unidades de produção em 2015 (STERN, 2017).

No Brasil, o uso do biogás vem ganhando relevância, e na última década tem sido utilizado como fonte energética nacional, principalmente, devido ao incentivo do mercado de créditos de carbono, que busca a redução das emissões do metano, um dos principais contribuintes para o efeito estufa (KUNZ, et al., 2019; CIBIOGAS, 2021).

Iniciado e integrado no modelo da “revolução verde” nos anos 70, a produção do biogás no país conta com 811 plantas em operação. Essas plantas utilizam como substratos os resíduos provenientes de atividades agropecuárias, agroindustriais, aterros sanitários e estações de tratamento de esgoto, chegando a obter produção de biogás acima de 350.000 m<sup>3</sup>/dia nas unidades de grande porte, o qual é utilizado como biometano, energia térmica, mecânica e elétrica (KUNZ, et al., 2019; CIBIOGAS, 2021).

Dado ao grande número de atividades agroindustriais e agropecuárias do estado de Minas Gerais, a implantação de empreendimentos de produção de biogás se apresenta como oportunidade para incrementar significativamente o grau de sustentabilidade desses setores, por meio da adequação a legislação ambiental, referente ao tratamento de resíduos e aumento da eficiência energética, com base na produção de energia de fontes renováveis (FEAM; GIZ; FIEMG, 2015).

### **3.4 Estudos para produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia do soro de queijo e esterco bovino**

É crescente o número de pesquisas que utilizam o soro de queijo em codigestão com o esterco bovino para produção de biogás, pois, além do dejetivo bovino conter microrganismos anaeróbios que são utilizados como culturas mistas para a produção de metano (AHRING et al., 2001), pode ser utilizado também, no intuito de oferecer maior equilíbrio ao processo, dado a sua maior alcalinidade e menor taxa de biodegradabilidade em relação ao soro de queijo (RICO et al., 2007; COMINO, ROSSO; RIGGIO, 2009; COMINO; RIGGIO; ROSSO, 2012; RICO; MUÑOZ; RICO, 2015; ESCALANTE, et al., 2018; HALLAJI; KUROSHKARIM; MOUSSAVI, 2019).

O esterco bovino é frequentemente utilizado em digestores anaeróbios como único substrato ou aplicado em codigestão com outros resíduos, pois está facilmente disponível e, é adequado para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios devido ao seu elevado teor de nitrogênio (WARD, et al., 2008).

O soro de queijo é rico em nutrientes e possui alta taxa de biodegradabilidade, porém o acúmulo de ácidos orgânicos formados, principalmente, pela degradação da lactose, pode levar a rápida acidificação do meio e ocasionar a inibição das arqueias produtoras de metano (HANSON; MOLIN, 1981; ERGÜDER et al., 2001; RICO; HALLAJI; KUROSHKARIM; MOUSSAVI, 2019; CHARALAMBOUS, 2021).

Comino et al. (2012), Bertin et al. (2013), Rico, Muñoz e Rico (2015) estudaram a viabilidade da codigestão anaeróbia do soro de queijo e esterco bovino em diferentes proporções, sem a adição de produtos químicos para a correção do pH, e observaram que é possível a utilização de soro de queijo na fração de até 85% para a produção de biogás, com o tempo de retenção hidráulica 15,6 dias. Porém, enfatizaram a obtenção de maior estabilidade do processo de acordo com o aumento da proporção do esterco bovino, e que o maior rendimento de metano foi alcançado na proporção de 50% de cada substrato.

Um dos poucos trabalhos que descrevem a comunidade microbiana da codigestão do permeado de soro de queijo com esterco bovino é de Hagen et al. (2014), os autores investigaram os perfis das comunidades microbianas em duas réplicas de reatores de tanque de agitação contínua, operando no limite de tolerância, devido a alimentação intensiva da mistura do permeado do soro de queijo e esterco bovino, e com adição de inóculo microbiano oriundos de biodigestor de resíduos alimentares. Apesar das condições serem as mesmas para os dois reatores, o primeiro reator (R1) apresentou desempenho estável e o segundo (R2) apresentou

acúmulo de ácido propiônico, e posteriormente, ácido acético, ocasionando a diminuição da produção de metano. A comunidade microbiana dos dois reatores foi dominada por Bacteroidetes, Firmicutes Methanobacteriales e Methanomicrobiales, mas com flutuações maiores das bactérias dominantes e arqueias em R2, o que pode explicar a não degradação do ácido propiônico por determinados grupos de bactéria e a consequente instabilidade do reator. Em 100 dias de operação, foram produzidos de 53 a 56% de metano em R1 e 30% em R2.

Escalante et al. (2018), avaliaram a produção de biogás a partir do soro de queijo de quatro indústrias de laticínios, e todas as amostras apresentaram potenciais para produção de metano na faixa de 0,51 a 0,60 L CH<sub>4</sub>/ g SV. O que representou, segundo os autores, uma economia de US \$ 6,91 por m<sup>3</sup> de soro de queijo de eletricidade, demonstrando que a digestão anaeróbia é uma alternativa viável para o tratamento do soro de queijo.

Ainda são escassos os estudos que utilizam o efluente bruto de laticínios como substrato para produção de biogás, porém, segundo a FEAM, GIZ e FIEMG (2015), a digestão anaeróbia deste efluente, como forma de redução de sua carga orgânica e produção de energia alternativa, pode contribuir para a melhor adequação ambiental da indústria de laticínios, assim como para o incremento de geração de receitas em decorrência do autoconsumo do biogás, como substituto dos combustíveis de caldeiras, ou ainda transformados em energia elétrica ou mecânica.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Ambiental Microbiana, localizado no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras (MG), e foi realizado em duas etapas, descritas a seguir:

### **4.1 Primeira etapa: Estudo do perfil de equilíbrio da codigestão do efluente de laticínio com esterco bovino e do potencial de adaptação do lodo resultante**

O intuito dessa primeira etapa foi estudar o efeito sinérgico do efluente de laticínio com esterco bovino para produção de biogás, por meio do processo de batelada, e com a reutilização do lodo oriundo das alimentações anteriores.

As amostras do esterco bovino foram coletadas no curral do setor de Bovinocultura de Corte do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e as amostras

de efluente de laticínios e de soro de queijo foram obtidas na Indústria de Laticínios situada em Lavras – MG.

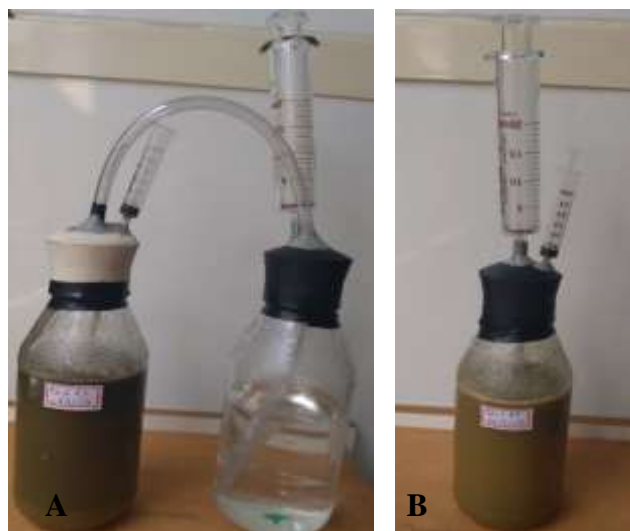
Os ensaios da codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com esterco bovino foram realizados em reatores anaeróbios de bancada, constituídos de frascos de vidro com volume total de 500 mL. Os frascos foram fechados com tampa de borracha, as quais continham acopladas, seringas de vidro esmerilhada para coleta dos gases e seringas de plástico, conectadas a tubos de plástico, para coleta do meio líquido.

Todos os ensaios foram mantidos em estufa *Shaker* a 35°C, e uma hora antes da coleta das amostras, ficavam sob agitação a 50 rpm, para a homogeneização do substrato.

O esterco bovino foi previamente diluído em água de abastecimento público, na proporção de 1:1 (SILVA, 2014). Em seguida, foi realizada a mistura de 200 mL de efluente de laticínio e 200 mL do esterco bovino diluído. Após isso, fez-se o peneiramento da mistura para a remoção do material inerte bruto.

Os ensaios foram realizados em dois tipos de aparatos experimentais, simultaneamente (adaptado de Aquino et al., 2007). No primeiro tipo de aparato, a seringa de vidro foi acoplada a um frasco de vidro contendo solução alcalina, para a quantificação de metano, o qual estava conectada ao reator por uma mangueira de borracha (Figura 7A), e no segundo aparato, a seringa de vidro foi acoplada diretamente ao reator para a quantificação de biogás total (Figura 7B).

Figura 7 - Reatores anaeróbios de bancada contendo a mistura de efluente de laticínio e esterco bovino a 50%. A – Reator acoplado diretamente a seringa de vidro para medição do biogás total. B – Reator acoplado ao frasco com solução de hidróxido de sódio para a medição do metano



Fonte: Da autora (2023).

Os ensaios foram conduzidos em três bateladas, com a reutilização do lodo das alimentações anteriores, constituídas de 30 dias cada, e foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 9 tratamentos e três repetições, cada. Os tratamentos são descritos a seguir:

Primeiro tratamento: estrume bovino líquido, adicionado de água destilada na proporção 1:1.

Segundo tratamento: Mistura do efluente de laticínio e esterco bovino líquido na concentração de 50% para cada substrato.

Terceiro tratamento: Mistura do efluente de laticínio e esterco bovino líquido na concentração de 50% para cada substrato, com adição de hidróxido de sódio, para ajuste do pH a 7,0.

Quarto tratamento: estrume bovino líquido, adicionado de água destilada na proporção 1:1, com adição de lodo da primeira batelada.

Quinto tratamento: Mistura do efluente de laticínio e esterco bovino líquido na concentração de 50% para cada substrato, com adição de lodo da primeira batelada.

Sexto tratamento: Mistura do efluente de laticínio e esterco bovino líquido na concentração de 50% para cada substrato, com adição de hidróxido de sódio, para ajuste do pH a 7,0, e adição de lodo da primeira batelada.

Sétimo tratamento: Água destilada e lodo resultante da primeira e segunda batelada.

Oitavo tratamento: Efluente de laticínio com adição de lodo da primeira e segunda batelada.

Nono tratamento: Efluente de laticínio com adição de hidróxido de sódio, para ajuste do pH a 7,0, e adição de lodo da primeira e segunda batelada.

Os tratamentos 1, 4 e 7 foram considerados os tratamentos controles, e no total, o experimento contou com 27 unidades experimentais.

Ao longo do período de incubação dos reatores, a cada 5 dias, foram realizadas a medição do volume do metano e do biogás total, e coleta de amostras da porção líquida para determinação do pH, quantificação de carboidratos e ácidos orgânicos, e para o isolamento dos microrganismos cultiváveis em meio de cultura de soro de queijo a cada 15 dias. No início e no final do período de incubação, também foram realizadas análises para a determinação da alcalinidade total, quantificação de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV).

Ao final de cada batelada os reatores foram abertos e foram coletados os sobrenadantes, e adicionados novos substratos sobre o lodo do processo anterior.

Após a coleta dos sobrenadantes, foi realizada a análise de pH e pesagem dos lodos, para verificar o volume necessário de cada etapa de alimentação, completando-se o volume de 400 mL (Tabelas 1 e 2). Ao final do período de incubação da última alimentação, os lodos foram pesados (Tabela 3) e foram coletadas amostras para análises de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), alcalinidade total e determinação do pH.

Tabela 1 - Pesos dos lodos obtidos da primeira alimentação e volume do substrato a adicionar na segunda alimentação

<b>Tratamento</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (%)</b>	<b>Substrato adicionado (mL)</b>
Água e esterco bovino	71,67	17,92	328,33
Efluente de laticínios e esterco bovino	86	21,5	314
Efluente de laticínios e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	77,33	19,33	322,67

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 2 - Pesos dos lodos obtidos da primeira e segunda alimentação e volume do substrato a adicionar na terceira alimentação

<b>Tratamento</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (%)</b>	<b>Substrato adicionado (mL)</b>
Água e esterco bovino	130	32,5	270
Efluente de laticínios e esterco bovino	157,5	39,37	242,5
Efluente de laticínios e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	118,67	29,67	281,33

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 3 - Pesos dos lodos obtidos da primeira, segunda e terceira alimentação

<b>Tratamento</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (%)</b>
Água e esterco bovino	98	24,5
Efluente de laticínios e esterco bovino	123,5	30,87
Efluente de laticínios e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	102,33	25,58

Fonte: Da autora (2023).



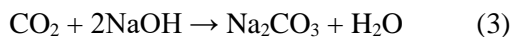
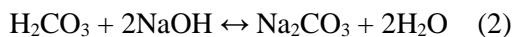
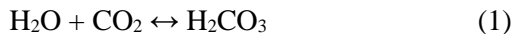
#### 4.1.1 Quantificação do volume do biogás e do metano

A determinação do volume do metano e do biogás total foi realizada segundo os procedimentos revisados por Aquino et al (2007).

##### Volume de metano

O metano foi quantificado a partir da remoção do CO<sub>2</sub> do biogás em solução alcalina de hidróxido de sódio a 15%, presente no recipiente acoplado ao reator. O gás produzido no reator passa pela mangueira e reage com a solução alcalina, e o metano desloca pela seringa de vidro, onde é quantificado diretamente pela leitura do seu volume.

A absorção do CO<sub>2</sub> ocorre de acordo com as seguintes reações:



##### Volume de biogás

O biogás total foi quantificado diretamente pela leitura do seu volume, a partir do deslocamento do êmbolo da seringa de vidro, acoplada a tampa do reator.

#### 4.1.2 Determinação do pH, alcalinidade total (AT), sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV)

Para a determinação do pH foi utilizado o pHmetro digital (Digimed).

A alcalinidade total foi determinada pela titulação da amostra com ácido sulfúrico 0,2 N até pH 4,5, utilizando o alaranjado de metila como indicador (American Public Health Association - APHA, 2012).

Os sólidos totais foram determinados pela metodologia fundamentada na evaporação da água por meio de secagem em estufa a 103-105°C até peso constante (APHA, 2012).

Os sólidos voláteis foram determinados pela metodologia fundamentada na calcinação das amostras resultantes da determinação dos sólidos totais, em forno mufla a 575°C por 2 horas (APHA, 2012).

## **4.2 Segunda etapa: Caracterização dos microrganismos e quantificação dos carboidratos, ácidos orgânicos e etanol do processo de codigestão anaeróbia**

Foram realizadas a caracterização dos microrganismos predominantes, e quantificação dos carboidratos consumidos e dos ácidos orgânicos produzidos, da codigestão anaeróbia com adição de hidróxido de sódio, da segunda alimentação, a qual obteve maior estabilidade de pH.

### **4.2.1 Cultivo e isolamento dos microrganismos da codigestão anaeróbia, em meio de cultura alternativo, composto de soro de queijo**

Foram realizados o cultivo e isolamento dos microrganismos, dos três tratamentos, da segunda alimentação dos reatores.

Amostras de 5 mL do meio líquido foram coletadas no primeiro dia do processo fermentativo e depois no intervalo de 15 dias. Alíquotas de 1 mL de cada amostra foram submetidas a diluição decimal e plaqueadas em meio de cultura composto de soro de queijo ácido.

#### **4.2.1.1 Preparo do meio de cultura**

Para o preparo do meio de cultura, foi utilizado o soro de queijo *in natura*, e foram realizadas análises cromatográficas para a quantificação da lactose, galactose, glicose, ácidos láctico, acético, butírico e propiônico, como descritas no tópico 4.3.3.

A utilização do soro de queijo como meio de cultura, foi baseada no trabalho de Nitschke, Rodrigues e Schinatto (2001).

Após a coleta de amostras para análises cromatográficas, o soro lácteo foi fervido para a desnaturação e sedimentação das proteínas, e logo após seu resfriamento foi coletado o sobrenadante.

Foi realizada a retirada de parte das proteínas do soro, antes de sua utilização, pois a formação de coágulos durante a esterilização, inviabiliza seu uso como meio de cultura.

Após este procedimento, foi adicionada água ultrafiltrada ao sobrenadante, na proporção de 1:1 e adicionado solução de sulfato de amônio, solução redutora de sulfeto de sódio e ágar (Tabela 4). O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio, e em seguida, foi feita a esterilização a 121°C/ 1 atm, por 20 minutos.

A solução de sulfeto de sódio (5%) e a solução de sulfato de amônio (5%) foram preparadas pela dissolução em água ultra purificada.

Tabela 4 - Composição do meio de cultura de soro de queijo para isolamento de microrganismos presentes na codigestão do efluente de laticínios e esterco bovino

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Função</b>
Soro de queijo	500 mL	Fonte de C
Água ultrapurificada	500 mL	
Solução de sulfeto de sódio (5%)	10 mL	Solução redutora
Solução de sulfato de amônio (5%)	10 mL	Fonte de N e tamponante
Ágar	20 g	

Fonte: Da autora (2023).

#### **4.2.1.2 Isolamento dos microrganismos da codigestão do efluente de laticínios e esterco bovino**

Para o cultivo dos microrganismos foi realizado o plaqueamento em profundidade. Foram adicionadas 1 mL das diluições seriadas das amostras às placas de Petri estéreis e recobertas com 20 mL do meio de soro. Os meios inoculados foram acondicionados em sacos a vácuo, para indução de atmosfera com baixa tensão de oxigênio (Figura 8A), e incubados em estufa à 35°C até a observação visual de colônias (Figura 8B). Logo após esse período, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), purificação por estriamento, análise morfológica (formato, tamanho, cor, textura e brilho) e preparo de lâminas para observação em microscopia óptica (MADIGAN et al. 2016).

#### **4.2.1.3 Identificação dos microrganismos isolados**

Após a confirmação da pureza dos isolados, esses foram preservados à -4°C com adição de solução de glicerol a 40%. Para identificação, as culturas foram reativadas em meio de cultura de soro de queijo a 35 °C e submetidas à técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz associada com tempo de voo e espectrômetro de massas (MALDI-TOF/MS).

Cada colônia foi transferida para o eppendorf, contendo 6 µL da solução orgânica (água, acetonitrila e ácido trifluoroacético) e homogeneizada em vórtex por 1 min. Em seguida, 0,5 µL desta suspensão foi transferida para a placa de aço inox do MALDI-TOF e foi adicionado 1

$\mu\text{L}$  da solução matriz de MALDI-TOF (75 mg/mL de ácido 2,5-di-hidroxibenzoico em etanol, água, acetonitrila e ácido trifluoroacético). Essa mistura foi seca à temperatura ambiente e a análise foi realizada em um sistema Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. Os espectros no intervalo de massa  $m/z = 2000$  a  $20000$  Da foram analisados no software Biotyper 2.0 (BrukerDaltonics) (LIMA-NETO et al., 2014).

#### 4.2.2 Quantificação dos carboidratos e ácidos orgânicos

Os carboidratos (lactose, glicose e galactose) e os ácidos orgânicos (lático, acético, butírico e propiônico) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Amostras de 2 mL foram coletadas com auxílio de seringa e congeladas, e foram preparadas seguindo a metodologia de Moraes et al. (2000). Após o preparo, foi injetado 1  $\mu\text{L}$  da amostra no cromatógrafo de fase líquida, *Shimadzu* modelo LC-10Ai (*Shimadzu Corp.*, Japão), equipado com os detectores de índice de refração (modelo RID-10<sup>a</sup>) e de ultravioleta (modelo SPD-10Ai). Foi utilizada a coluna de troca catiônica (poliestireno divinil-benzeno), Shim-pack SCR-101H (7,9 mm x 30 cm) (*Shimadzu*). A coluna cromatográfica operou a temperatura de 50 °C e a fase móvel utilizada foi o ácido perclórico (pH 2,1) a um fluxo de 0,6 mL/min, sendo utilizado o detector de ultravioleta, com comprimento de onda de 210 nm.

#### 4.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos de todas as variáveis analisadas foram submetidos ao teste de normalidade por Shapiro-Wilk a 95% de significância e à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o *software* SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2011), para avaliação das fontes de variação, e posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% pelo mesmo *software*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização físico-química do efluente de laticínio e do esterco bovino

A caracterização físico-química do efluente de laticínio e do esterco bovino utilizados nas três alimentações dos reatores anaeróbios, encontra-se nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Caracterização físico-química do efluente de laticínio utilizado nas três alimentações dos reatores anaeróbios

<b>Parâmetro</b>	<b>1<sup>a</sup> Alimenta- ção</b>	<b>2<sup>a</sup> Alimentação</b>	<b>3<sup>a</sup> Alimentação</b>
Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	4,39	4,99	5,32
Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	3,35	3,87	4,18
Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	350,0	310,0	290,0
pH	5,32	4,65	4,15

Fonte: Da autora (2023)

Tabela 6 - Caracterização físico-química do esterco bovino diluído (1:1) utilizado nas duas alimentações dos reatores anaeróbios

<b>Parâmetro</b>	<b>1<sup>a</sup> Alimentação</b>	<b>2<sup>a</sup> Alimentação</b>
Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	104,88	101,73
Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	94,24	88,95
Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	2.700,0	2.430,0
pH	6,1	5,76

Fonte: Da autora (2023)

Observa-se, que os efluentes de laticínio utilizados em todas as alimentações, apresentaram pH ácido, encontrando-se, portanto, fora da faixa ótima de atuação das arqueias metanogênicas, que de acordo com Chernicharo (2019), situa-se entre 6,6 a 7,4. O estrume bovino diluído na proporção de 1:1, das duas alimentações, apresentaram valores de pH mais

elevados em relação aos efluentes de laticínio, porém, ainda adversos a atuação das arqueias metanogênicas.

Quanto a alcalinidade total dos resíduos, observa-se valores entre 290 a 350 mg.L<sup>-1</sup> para os efluentes de laticínio e de 2.430 e 2.700 mg.L<sup>-1</sup> para o esterco bovino, demonstrando a elevada alcalinidade do esterco bovino em relação ao efluente de laticínio. Segundo Raposo et al. (2012) e Chernicharo (2019), a alcalinidade total, expressa em miligrama de carbonato de cálcio por litro, confere a capacidade de tamponamento do meio, para valores entre 2.500 e 5.000 mg.L<sup>-1</sup>.

O esterco bovino, além de ser fonte de microrganismos metanogênicos e ser utilizado como único substrato em biodigestores, é também utilizado como complemento a outros resíduos, que possuem maior taxa de acidificação, pois apresenta elevada alcalinidade, alto teor energético e baixa biodegradabilidade, o que garante o efeito tamponante do processo e confere melhor equilíbrio da relação C/N para o crescimento microbiano (WARD, et al., 2008; YAN et al., 2015).

## **5.2 Desempenho da codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com esterco bovino**

Os parâmetros físico-químicos das codigestões anaeróbias do efluente de laticínio com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio e da digestão anaeróbia do esterco bovino, da primeira e segunda alimentação, encontram-se nas tabelas 7, 8, 9 e 10, e nas figuras 8 e 9.

Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais da digestão anaeróbia do esterco bovino e das codigestões anaeróbias do efluente de laticínio e esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, da primeira alimentação (0-30 dias)

<b>Tratamento</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Inicial</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Final</b>	<b>Desvio Padrão</b>
1 - Água destilada e esterco bovino	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	18,88	0	9,12	0,51
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	15,50	0	4,93	0,17
	Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	850,0	0	2.500,0	330
	pH	6,28	0	7,18	0,14
	Produção de biogás (mL)	0	0	12,17	4,58
	Produção de metano (mL)	0	0	1,33	0,14
2 - Efluente de laticínio e esterco bovino	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	23,03	0	11,65	1,55
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	18,76	0	8,02	0,98
	Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	1.450,0	0	3.300,0	540
	pH	5,93	0	6,96	0,10
	Produção de biogás (mL)	0	0	3,83	1,24
	Produção de metano (mL)	0	0	0,66	0,16
3 - Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	24,0	0	11,28	0,72
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	17,12	0	6,07	0,91
	Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	2.400,0	0	3.400,0	2,80
	pH	7,0	0	7,03	0,04
	Produção de biogás (mL)	0	0	14,66	4,35
	Produção de metano (mL)	0	0	2,66	0,44

Fonte: Da autora (2023)

Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais da digestão anaeróbia do esterco bovino e das codigestões anaeróbias do efluente de laticínios e esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, da segunda alimentação (31- 60 dias)

Tratamento	Parâmetro	Inicial	Desvio Padrão	Final	Desvio Padrão
4 - Água destilada e esterco bovino	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	17,36	0	7,93	1,07
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	13,91	0	4,61	1,41
	Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	1.100,0	0	2.900,0	350
	pH	5,78	0	7,31	0,20
	Produção de biogás (mL)	0	0	19,67	6,49
	Produção de metano (mL)	0	0	2,33	0,47
5 - Efluente de laticínio e esterco bovino	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	17,45	0	10,10	1,37
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	13,41	0	6,83	1,47
	Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	2.700,0	0	3.100,0	400
	pH	5,14	0	6,70	0,03
	Produção de biogás (mL)	0	0	9,50	4,55
	Produção de metano (mL)	0	0	0	0
6 - Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	22,75	0	8,96	1,04
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	16,65	0	4,51	0,52
	Alcalinidade total (mg <sub>CaCO3</sub> .L <sup>-1</sup> )	3.200,0	0	4.400,0	540
	pH	7,0	0	7,56	0,11
	Produção de biogás (mL)	0	0	28,67	12,33
	Produção de metano (mL)	0	0	2,51	0,81

Fonte: Da autora (2023)

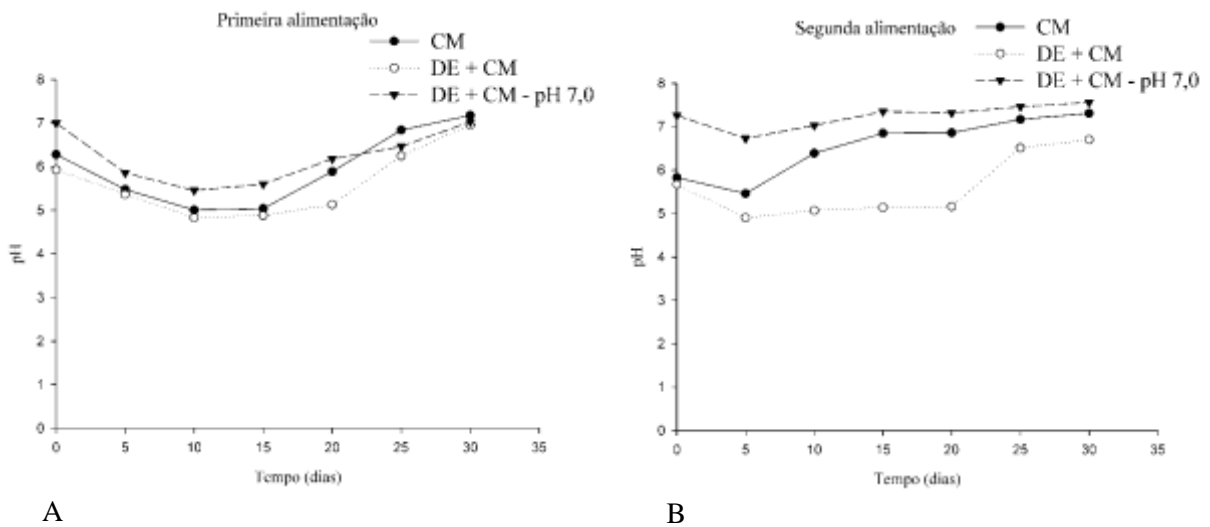
Destaca-se que, a mistura de efluente de laticínio com o esterco bovino e o esterco bovino acrescido de água destilada (Tabelas 7 e 8), apresentaram pH ácido e fora do intervalo propício ao crescimento do consórcio metanogênico (6,0 a 8,0) (WARD et al., 2008; RAPOSO et al., 2012; CHERNICHARO, 2019). Isto demonstrou que o esterco bovino na proporção de 50%, não proporcionou a alcalinidade inicial desejável para a estabilidade do sistema e formação de metano. Sendo assim, a capacidade de tamponamento do sistema foi estudada ao longo do tempo.

Chernicharo (2019) relata que, diversos produtos químicos podem ser utilizados para controlar o pH dos processos anaeróbios, e dentre eles, encontra-se o hidróxido de sódio (NaOH), o qual fornece alcalinidade bicarbonato diretamente ao sistema. Porém, no presente trabalho, observa-se que as codigestões anaeróbias, onde foram realizadas as suplementações



iniciais com hidróxido de sódio, apresentaram queda do pH nos primeiros dias de incubação (Figura 8 A, B). Entretanto, nota-se que, a codigestão com hidróxido de sódio, da segunda alimentação, onde foi realizada a reutilização do lodo na quantidade de 19,33% em relação ao substrato, apresentou queda somente nos cinco dias iniciais e, ainda, apresentou-se dentro da faixa de neutralidade (Figura 8 B), condição ideal para a produção de metano (WARD et al., 2008; RAPOSO et al., 2012; CHERNICHARO, 2019), demonstrando o efeito do lodo no equilíbrio do pH do sistema.

Figura 8 - pH da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da primeira e segunda alimentação. A – Primeira alimentação. B – Segunda alimentação. CM = Esterco bovino; DE + CM = Efluente de laticínio e esterco bovino; DE + CM - pH 7,0 = Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH para 7,0



Fonte: Da autora (2023)

Todos os tratamentos, das duas alimentações, apresentaram incremento de pH e de alcalinidade total durante o processo (Tabela 7, 8 e 9), obtendo-se, ao final de cada trinta dias, os valores recomendados de pH (entre 6,0 a 8,0) e de AT (entre 2.500 a 5.000 mg.L<sup>-1</sup>) para o desenvolvimento do consórcio metanogênico e efeito tamponante do meio (WARD et al., 2008; RAPOSO et al., 2012; CHERNICHARO, 2019). Porém, observa-se que, os maiores incrementos de pH ocorreram nos ensaios onde não foram utilizados hidróxido de sódio (Tabela 9), o que denota a capacidade intrínseca do sistema em adquirir alcalinidade.

Tabela 9 - Incremento de pH e alcalinidade total (AT), remoção de sólidos voláteis (SV) e rendimento de biogás e de metano da digestão anaeróbia do esterco bovino e das codigestões anaeróbias do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, da primeira e segunda alimentação. Médias com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância

Alimenta- ção	Tratamento	Incremen- to de pH	Incremen- to de AT (mg.L <sup>-1</sup> )	Remoção de SV (%)	Rendimen- -to de biogás (mL <sup>biogás</sup> .g <sup>SV</sup> - <sup>1</sup> )	Rendimen- -to de metano (mL <sub>CH<sub>4</sub></sub> .g <sup>SV</sup> - <sup>1</sup> )
Primeira (0-30 dias)	1 - Água e esterco bovino	0,9 <sup>c</sup>	1.650,0 <sup>a</sup>	68,19 <sup>a</sup>	2,87 <sup>bc</sup>	0,31 <sup>bc</sup>
	2 - Efluente de laticínio e esterco bovino	1,03 <sup>c</sup>	1.850,0 <sup>a</sup>	57,25 <sup>bc</sup>	0,89 <sup>c</sup>	0,16 <sup>cd</sup>
	3 - Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	0,03 <sup>e</sup>	1.000,0 <sup>b</sup>	64,54 <sup>ab</sup>	3,31 <sup>bc</sup>	0,6 <sup>ab</sup>
Segunda (31-60 dias)	4 - Água com esterco bovino	2,23 <sup>a</sup>	1.800,0 <sup>a</sup>	66,86 <sup>ab</sup>	6,42 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>
	5 - Efluente de laticínio com esterco bovino	1,56 <sup>b</sup>	400,0 <sup>c</sup>	49,07 <sup>c</sup>	4,59 <sup>ab</sup>	0 <sup>d</sup>
	6 - Efluente de laticínio com esterco bovino, com correção de pH (7,0)	0,56 <sup>d</sup>	1.200,0 <sup>b</sup>	72,91 <sup>a</sup>	7,31 <sup>a</sup>	0,64 <sup>a</sup>

Fonte: Da autora (2023)

Com o aumento do pH e da alcalinidade ao longo do tempo, observa-se, também, que os lodos resultantes, apresentaram-se dentro da faixa de pH de atuação das produtoras de metano (Tabela 10), de acordo com Ward et al. (2008), Raposo et al. (2012) e Chernicharo (2019) contribuindo, assim, para o efeito tamponante do sistema.

Tabela 10 - pH dos lodos resultantes da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio da primeira e segunda alimentação, e da digestão dos efluentes de laticínio, sem e com hidróxido de sódio, da terceira alimentação

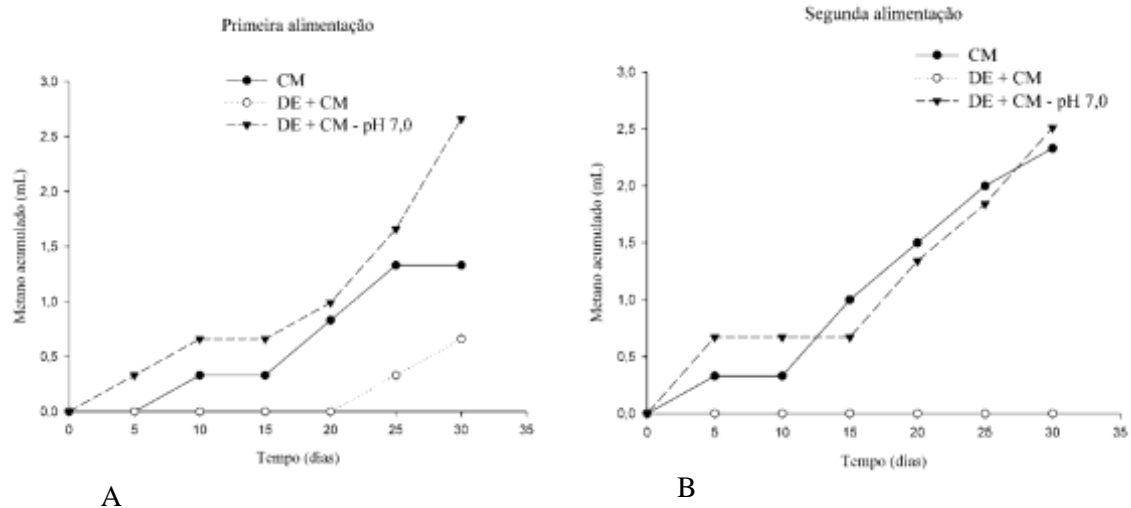
<b>Alimentação</b>	<b>Lodo do tratamento</b>	<b>pH</b>
Primeira (0-30 dias)	Água e esterco bovino	7,05
	Efluente de laticínio e esterco bovino	6,28
	Efluente de laticínio e esterco bovino com correção de pH (7,0)	7,30
Segunda (31-60 dias)	Água e esterco bovino	7,05
	Efluente de laticínio e esterco bovino	6,55
	Efluente de laticínio e esterco bovino com correção de pH (7,0)	7,48
Terceira (61-90 dias)	Água	6,90
	Efluente de laticínio	6,68
	Efluente de laticínio com correção de pH (7,0)	7,44

Fonte: Da autora (2023)

Todos os tratamentos apresentaram baixa produção de biogás e de metano (Tabelas 7, 8 e 9), e tratando-se do rendimento das codigestões anaeróbias, verifica-se que os ensaios com suplementação com hidróxido de sódio, da primeira e da segunda alimentação, na qual foi reutilizado o lodo, apresentaram o mesmo rendimento de metano (Tabela 9), demonstrando que não houve efeito significativo do lodo na produção deste gás. Quanto ao biogás total, verifica-se maior rendimento na codigestão com reaproveitamento do lodo (Tabela 9).

Na dinâmica da produção de metano ao longo de cada trinta dias, na primeira alimentação, somente o ensaio de codigestão com suplementação de alcalinidade, apresentou produção de metano desde o início. Até o vigésimo dia, não houve produção na codigestão sem adição de hidróxido de sódio, o que pode ser devido a sua baixa alcalinidade, observando-se o início da produção deste gás (Figura 9 A), a partir do início do aumento do pH (Figura 8 A). Já na segunda alimentação, observa-se que não houve produção de metano, na codigestão sem correção de pH (Figura 9 B), o que mais uma vez, pode estar relacionada a elevada acidez do substrato.

Figura 9 - Produção acumulada de metano da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da primeira e segunda alimentação. A – Primeira alimentação. B- Segunda alimentação. CM = Esterco bovino; DE + CM = Efluente de laticínio e esterco bovino; DE + CM - pH 7,0 = Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH para 7,0



Fonte: Da autora (2023)

### 5.3 Potencial de adaptação do lodo ao efluente de laticínio, visando seu uso como inóculo para partida da digestão anaeróbia

Os parâmetros físico-químicos das digestões anaeróbias dos efluentes de laticínio, sem e com adição de hidróxido de sódio da terceira alimentação, encontram-se nas tabelas 11, 12 e 13, e nas figuras 10 e 11.

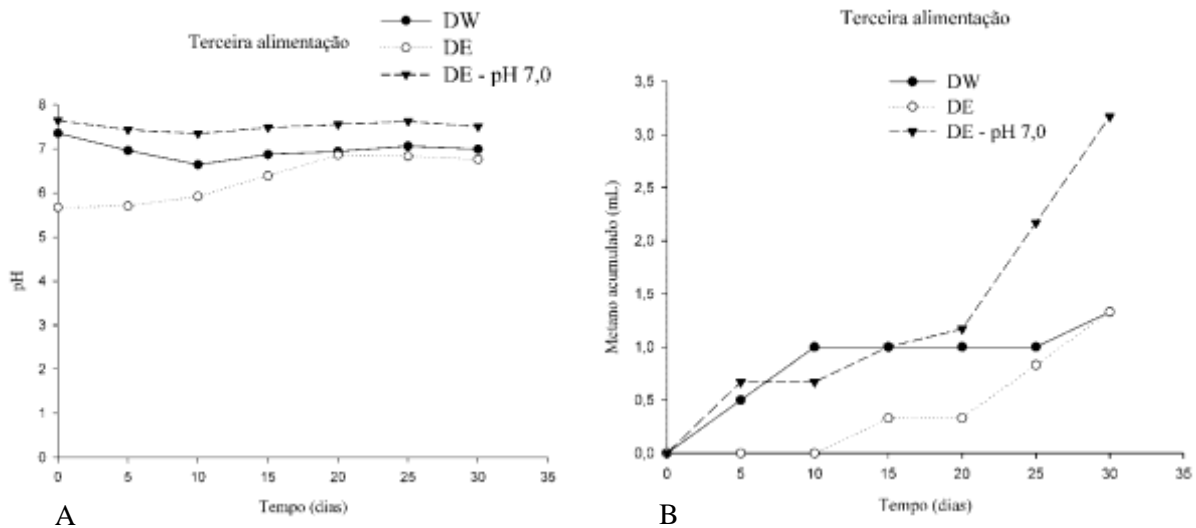
Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos iniciais e finais da digestão anaeróbia do lodo do esterco bovino e das digestões anaeróbias do efluente de laticínio, sem e com hidróxido de sódio, da terceira alimentação (61-90 dias)

Tratamento	Parâmetro	Inicial	Desvio Padrão	Final	Desvio Padrão
7 - Água destilada	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	-	-	2,65	0,50
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	-	-	1,63	0,57
	Alcalinidade total (mgCaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	-	-	800,0	89
	pH	-	-	6,99	0,02
	Produção de biogás (mL)	0	0	10,67	3,16
	Produção de metano (mL)	0	0	1,33	0,27
	8 - Efluente de laticínio	Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	5,76	0	5,32
Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )		4,18	0	2,23	0,52
Alcalinidade total (mgCaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )		290,0	0	1.700,0	345
pH		4,15	0	6,76	0,01
Produção de biogás (mL)		0	0	6,84	1,66
Produção de metano (mL)		0	0	1,33	0,16
9 - Efluente de laticínio com correção de pH (7,0)		Sólidos totais (g.L <sup>-1</sup> )	7,28	0	5,58
	Sólidos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )	4,80	0	2,15	0,25
	Alcalinidade total (mgCaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	1.392,0	0	3.400,0	320
	pH	7,0	0	7,5	0,15
	Produção de biogás (mL)	0	0	22,5	7,5
	Produção de metano (mL)	0	0	3,17	0,63

Fonte: Da autora (2023)

Na terceira alimentação, constituída somente por efluente de laticínio, o lodo proporcionou ganho de pH inicial ao sistema (Figura 11 A). Os efluentes de laticínio sem e com adição de hidróxido de sódio, apresentaram um aumento de pH de 4,15 para 5,67 e de 7,0 para 7,64, respectivamente (Tabela 11 e Figura 11 A).

Figura 10 - pH e produção acumulada de metano da digestão anaeróbia do esterco bovino e da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios com esterco bovino, sem e com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da terceira alimentação. A – pH. B – Produção acumulada de metano. DW = água destilada; DE = Efluente de laticínio; DE – pH 7,0 = Efluente de laticínio com correção de pH para 7,0



Fonte: Da autora (2023)

Nota-se maior equilíbrio do pH durante a digestão anaeróbia do efluente de laticínio com hidróxido de sódio, a qual manteve-se numa maior faixa de neutralidade (Figura 10 A), em relação as alimentações anteriores (Figura 9 A, B), demonstrando o efeito tamponante do lodo, provindo da codigestão do esterco bovino com o efluente de laticínio, com pH de 7,48 (Tabela 9) e na proporção de 29,67% em relação ao substrato (Tabela 2).

Houve incremento de pH e de alcalinidade total durante a digestão dos efluentes de laticínio (Tabela 12), e observa-se que, assim como, nas alimentações anteriores, não houve produção de metano nos primeiros dias da digestão sem correção de pH, demonstrando novamente, a influência da elevada acidez do substrato na produção deste gás (Figura 10 B). Em contrapartida, nota-se maior rendimento de metano no ensaio onde foi realizado a suplementação de alcalinidade com hidróxido de sódio (Figura 10 B), obtendo-se o pH inicial dentro da faixa de neutralidade e maior estabilidade ao longo do tempo (Figura 10 A).

Tabela 12 - Incremento de pH e alcalinidade total (AT), remoção de sólidos voláteis (SV) e rendimento de biogás e metano da digestão anaeróbia do efluente de laticínios, sem e com hidróxido de sódio, da terceira alimentação. Médias com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância

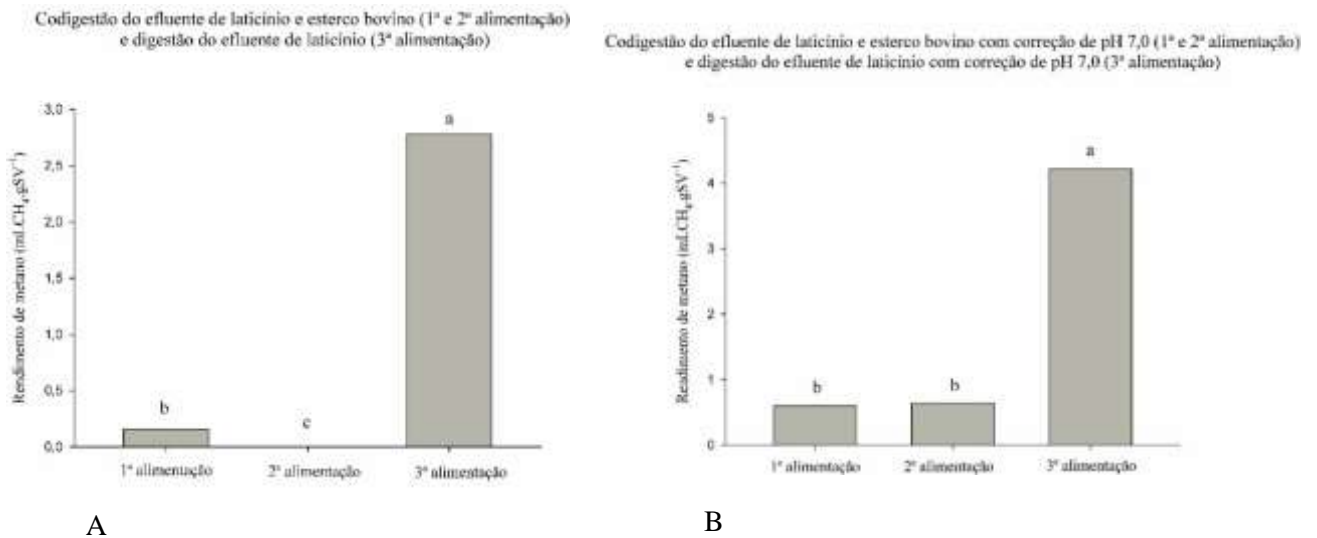
Alimen- tação	Tratamento	Incre- mento de pH	Incre- mento de AT (mg.L <sup>-1</sup> )	Remo- ção de SV (%)	Rendi- mento de biogás (mL <sub>biogás</sub> .gV)	Rendi- mento de metano (mL <sub>CH<sub>4</sub></sub> .gSV)
	Água	-	-	-	-	-
Terceira (61-90 dias)	Efluente de laticínio	2,61 <sup>a</sup>	1.410,0 <sup>b</sup>	47,05 <sup>b</sup>	14,24 <sup>b</sup>	2,78 <sup>b</sup>
	Efluente de laticínio com correção de pH (7,0)	0,5 <sup>b</sup>	2.010,0 <sup>a</sup>	55,21 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	4,22 <sup>a</sup>

Fonte: Da autora (2023)

De acordo com Field, Alvarez, Lettinga (1988), Raposo et al. (2009), Schievano et al. (2010), a atividade metanogênica está relacionada ao grau de adaptação do lodo ao substrato. Geralmente, na primeira alimentação, inicia-se a adaptação das arqueias metanogênicas ao composto, e a partir desta etapa, ocorrerá o aumento da atividade em alimentações consecutivas, devido ao crescimento de novas células. Assim, quando se tem a intenção de estudar a capacidade de adaptação do inóculo ao substrato, o ideal é que o lodo seja exposto a alimentações sucessivas de substrato, com eliminação do sobrenadante ao final de cada período de incubação. Se a atividade aumentar com as alimentações, será um indicativo de adaptação do inóculo ao substrato.

Verifica-se na figura 11 A, B, que houve aumento de rendimento de metano nos tratamentos da terceira alimentação, o que indica o potencial de adaptação do lodo das codigestões anteriores, ao efluente de laticínio, podendo, portanto, o mesmo ser utilizado como inóculo, para a partida da digestão anaeróbia deste substrato. A caracterização do lodo obtido em todos tratamentos, ao final da terceira alimentação, é apresentada na tabela 13.

Figura 11 - Rendimento de metano das codigestões anaeróbias do efluente de laticínios e esterco bovino e da digestão anaeróbia do efluente de laticínio. A - Codigestão anaeróbia do efluente de laticínio e estrume bovino (1ª e 2ª alimentação) e digestão anaeróbia do efluente de laticínio (3ª alimentação). B - Codigestão anaeróbia do efluente de laticínio e estrume bovino, com hidróxido de sódio (1ª e 2ª alimentação) e digestão anaeróbia do efluente de laticínio, com hidróxido de sódio (3ª alimentação). Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância



Fonte: Da autora (2023)

Tabela 13 - Caracterização físico-química do lodo obtido ao final da terceira alimentação da digestão do esterco bovino, das codigestões do efluente de laticínio e estrume bovino, sem e com hidróxido de sódio, e das digestões do efluente de laticínio sem e com hidróxido de sódio

Tratamento	pH	Alcalinidade Total (mg.L <sup>-1</sup> )	Sólidos Totais (g.L <sup>-1</sup> )	Sólidos Voláteis (g.L <sup>-1</sup> )
Água com esterco bovino / Água	6,9	1.900,0	32,92	25,50
Efluente de laticínio e esterco bovino / Efluente de laticínio	6,68	2.800,0	32,43	26,41
Efluente de laticínio e esterco bovino com correção de pH (7,0) / Efluente de laticínio com correção de pH (7,0)	7,44	5.500,0	36,67	23,54

Fonte: Da autora (2023)

O lodo oriundo da digestão anaeróbia, comumente utilizado como inóculo em outros reatores é constituído por biomassa metanogênica, por material biodegradável remanescente e por sólidos insolúveis, o que lhe confere características microbiológicas e físico-químicas

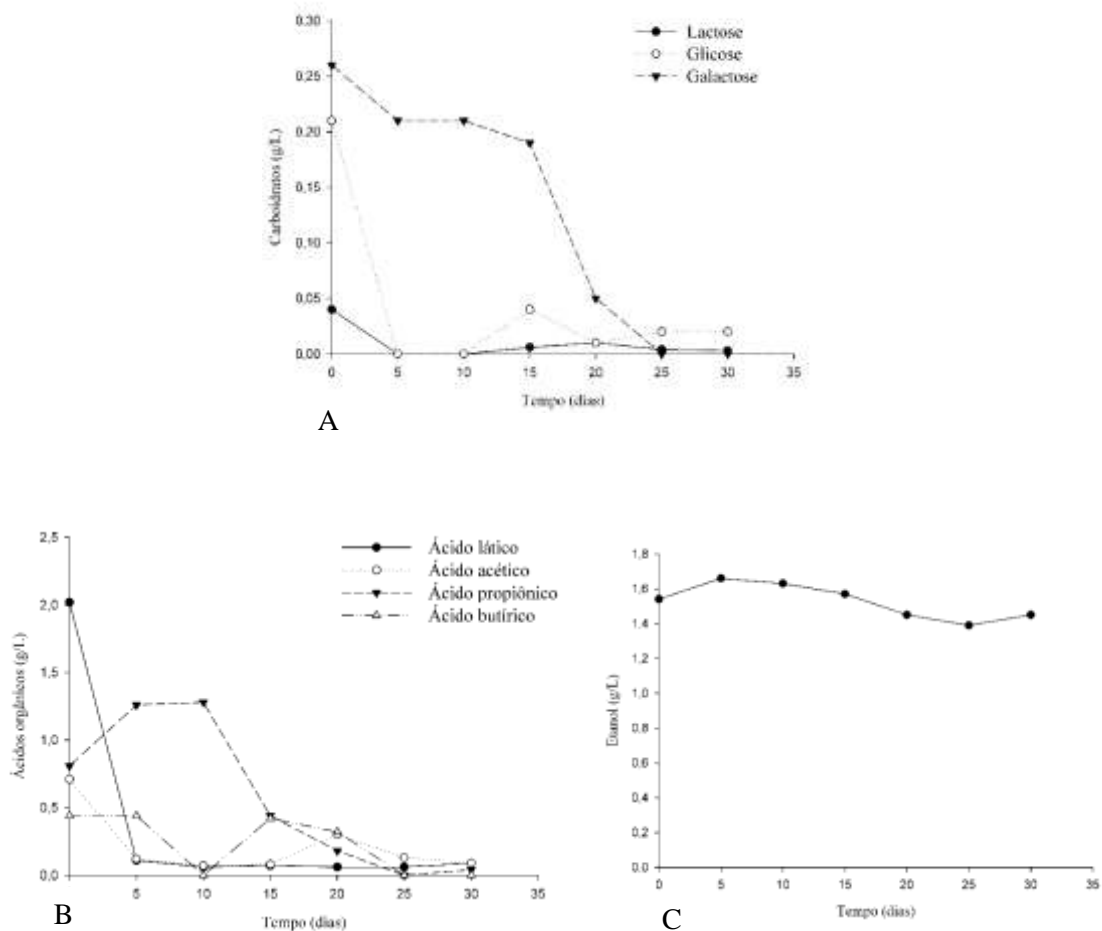


desejáveis, como efeito tamponante, maior agilidade na conversão da matéria orgânica e consequentemente, menores efeitos inibitórios do substrato na produção de metano (GRIFFIN et al.,1998; CHERNICHARO, 2019).

#### 5.4 Consumo de carboidratos e produção de ácidos orgânicos e etanol da codigestão anaeróbia do efluente de laticínio e esterco bovino, com hidróxido de sódio

Os dados do consumo de carboidratos e produção de ácidos orgânicos e etanol durante a codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com esterco bovino, com hidróxido de sódio, da segunda alimentação, são apresentados na figura 12.

Figura 12 - Consumo de carboidratos e produção de ácidos orgânicos e etanol da codigestão anaeróbia do efluente de laticínios e esterco bovino, com hidróxido de sódio, ao longo de trinta dias, da segunda alimentação. A – Carboidratos. B – Ácidos orgânicos. C- Etanol



Na dinâmica do consumo de substratos e produção de metabólitos pelo consórcio metanogênico, ao longo de 30 dias, verifica-se, que a mistura do efluente de laticínio e esterco bovino, na proporção de 50%, apresentou em sua composição, a predominância de ácido láctico e etanol. Os carboidratos – lactose, glicose e galactose, substratos das bactérias acidogênicas (CHERNICHARO, 2019) foram encontrados em menores quantidades.

Os ácidos orgânicos, substratos das acetogênicas produtoras de hidrogênio obrigatórias (CHERNICHARO, 2019), foram consumidos ao longo dos trinta dias, observando-se uma maior presença de ácido propiônico nos quinze dias iniciais, o qual é resultante, principalmente, da fermentação dos carboidratos e proteínas, correspondendo a 30% da conversão da matéria orgânica (CHERNICHARO, 2019).

Segundo Chernicharo (2019), o equilíbrio da digestão anaeróbia de compostos orgânicos pode ser averiguado pela análise dos ácidos orgânicos, pois os mesmos são os principais metabólitos e substratos do consórcio de microrganismos do processo, e uma identificação dos ácidos individuais em um reator em desequilíbrio, poderá indicar qual grupo de microrganismo não se encontra ativo no sistema.

Observa-se, que não houve acúmulo de ácidos orgânicos intermediários na codigestão anaeróbia, e que, os ácidos, acético e propiônico, principais precursores da formação de metano, foram consumidos ao longo do tempo. Porém, verifica-se que não houve consumo relevante de etanol, pelas bactérias acetogênicas, o qual apresentou-se, no final, em expressiva quantidade (Figura 12), o que pode ter contribuído para baixa produção de metano, dada a indisponibilidade de acetato.

Na tabela 14, Foresti (1994), Lettinga et al. (1996) e Aquino e Chernicharo (2005), apresentam a comparação energética de algumas reações comuns na degradação anaeróbia:

Tabela 14 - Comparação energética de algumas reações comuns na degradação anaeróbia

Nº	Acidogênese				$\Delta G^0$ (kJ/reação)
1	Glicose ð Acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O$	ð	$2CH_3COO^- + 2H^+ + 4H_2$	-206
2	Glicose ð Propionato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2$	ð	$2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-308
3	Glicose ð Butirato	$C_6H_{12}O_6$	ð	$CH_3CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$	-255
Acetogênese					
4	Bicarbonato ð Acetato	$2HCO_3^- + 4H_2 + H^+$	ð	$CH_3COO^- + 4H_2O$	-104,6
5	Propionato ð Acetato	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O$	ð	$CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+76,1
6	Propionato ð Acetato	$CH_3CH_2COO^- + 2HCO_3^-$	ð	$CH_3COO^- + H^+ + 3HCOO^-$	+72,2
7	Butirato ð Acetato	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O$	ð	$2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48,1
8	Etanol ð Acetato	$CH_3CH_2COH + H_2O$	ð	$CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+9,6
9	Lactato ð Acetato	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O$	ð	$CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$	-4,2
Metanogênese e Sulfetogênese					
10	Acetato ð Metano	$CH_3COO^- + H_2O$	ð	$CH_4 + HCO_3^-$	-31,0
11	Hidrogênio ð Metano	$H_2 + \frac{1}{4} HCO_3^- + \frac{1}{4} H^+$	ð	$\frac{1}{4} CH_4 + \frac{3}{4} H_2O$	-33,9
12	Formiato ð Metano	$HCOO^- + \frac{1}{4} H_2O + \frac{1}{4} H^+$	ð	$\frac{1}{4} CH_4 + \frac{3}{4} HCO_3^-$	-32,6
13	Bicarbonato ð Metano	$HCO_3^- + 4H_2 + H^+$	ð	$CH_4 + 3H_2O$	-135,6
14	Sulfato ð Sulfeto	$SO_4^{2-} + 4H_2 + H^+$	ð	$HS^- + 4H_2O$	-151,9

Fonte: Adaptado de Foresti (1994), Lettinga et al. (1996) e Aquino e Chernicharo (2005).

Observa-se que, a reação da degradação do etanol a acetato, não é termodinamicamente favorável na condição padrão ( $\Delta G^0 > 0$ ), entretanto, segundo os autores, elas ocorrem naturalmente em reatores anaeróbios, dada a interação dos microrganismos acetogênicos com os metanogênicos consumidores de hidrogênio.

Os substratos para as bactérias acetogênicas, inicialmente encontrados em maiores quantidades foram o ácido lático e etanol. O ácido lático foi rapidamente consumido pelas acetogênicas, porém houve um consumo insignificante de etanol, e isso pode ter ocorrido, pelo fato da reação de degradação do acetato ser termodinamicamente favorável, e a do etanol, termodinamicamente desfavorável, necessitando assim, da relação sintrófica com metanogênicos hidrogenotróficos e bactérias redutoras de sulfato, para a manutenção do ambiente com baixa pressão de hidrogênio.

De acordo com Mosey (1983) e Chernicharo (2019), os microrganismos metanogênicos apresentam baixas taxas de crescimento em relação aos acidogênicos (acidogênicas: ~30 minutos, metanogênicas hidrogenotróficas: 6 horas e metogênicas acetoclásticas: 2 a 3 dias), e isso demonstra que a limitação cinética dos metanogênicos pode ter ocasionado a limitação termodinâmica do consumo do etanol pelas acetogênicas, ocasionada pelo provável acúmulo de hidrogênio no sistema.

O esterco bovino apresenta-se como um bom inóculo para resíduos com alta taxa de degradação, porque além da presença dos microrganismos metanogênicos, ele é rico em material lignocelulósico, característica complementar a esses tipos de substratos (LIN, RASKIN E STAHL, 1997; JANSSEN E KIRST, 2008; KONG *et al.*, 2010; WARD, *et al.*, 2008). Porém, estes microrganismos metanogênicos necessitam de um tempo de adaptação ao serem inoculados em outros compostos orgânicos, o que pode causar uma limitação cinética inicial, pelo baixo número de células, com efeitos inibitórios do substrato na produção de metano (CHERNICHARO, 2019).

Esta limitação cinética pode ser solucionada pelo processo de adaptação do inóculo, ao novo substrato, ao longo do tempo, com crescimento de novas células e maior atividade metanogênica, como foi demonstrado no presente trabalho, com o aumento do rendimento de metano a partir da terceira alimentação.

### **5.5 Cultivo e isolamento dos microrganismos acidogênicos, em meio de cultura alternativo, composto de soro de queijo**

O meio de cultura composto de soro de queijo apresentou-se propício ao crescimento de uma diversidade de microrganismos presentes na codigestão anaeróbia do efluente de laticínio com esterco bovino.

O soro, que é a fração líquida que se separa da massa durante a fabricação do queijo, apresenta uma composição média de 5% de lactose, 0,7 a 0,9% de proteínas, 0,3 a 0,5% de lipídeos, 0,5% de sais minerais (Ca, Mg, K, Na, Cl, Zn, Fe e Cu) e 93% de água. Os seus constituintes são variáveis de acordo com a composição do leite e a tecnologia utilizada no processo de fabricação (FURTADO; POMBO, 1988; FITZSIMONS *et al.*, 2006).

Os carboidratos, etanol e ácidos orgânicos encontrados no soro de queijo, utilizado como meio de cultura são apresentados na tabela 13.

Tabela 15 - Carboidratos, etanol e ácidos orgânicos presentes no soro de queijo *in natura*, utilizado como meio de cultura

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Lactose	9,39
Glicose	6,13
Galactose	5,35
Etanol	2,58
Ácido láctico	5,82
Ácido cético	0,22
Ácido propiônico	0,04
Ácido butírico	0,00

Fonte: Da autora (2023)

Trinta microrganismos foram isolados no início, aos 15 dias e aos 30 dias do período de incubação dos três tratamentos. Os gêneros e as espécies de bactérias identificados por MALDI-TOF e suas respectivas contagens, encontram-se na tabela 16.

Tabela 16 - Gêneros e espécies de bactérias identificadas ao longo dos 30 dias de incubação da digestão do esterco bovino e das codigestões sem e com adição de hidróxido de sódio, da segunda alimentação. (Continua)

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>UFC/mL</b>	
0	Água e esterco bovino	<i>Lysinibacillus</i> sp.	1,53 x 10 <sup>7</sup>	
		Bacilo Gram-positivo	7,10 x 10 <sup>6</sup>	
		Cocos Gram-negativos	3,40 x 10 <sup>6</sup>	
	Efluente de laticínio e esterco bovino	<i>Bacillus cereus</i>	2,40 x 10 <sup>6</sup>	
		Cocos Gram-negativos	1,02 x 10 <sup>5</sup>	
		Bacilo Gram-positivo	5,50 x 10 <sup>5</sup>	
		Bacilo Gram-negativo	4,60 x 10 <sup>5</sup>	
		Bacilo Gram-negativo	2,70 x 10 <sup>5</sup>	
		Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	<i>Bacillus cereus</i>	3,30 x 10 <sup>7</sup>
			Bacilo Gram-negativo	7,20 x 10 <sup>6</sup>
15	Água e esterco bovino	<i>Bacillus</i> sp.	1,97 x 10 <sup>7</sup>	
	Efluente de laticínio e esterco bovino	<i>Bacillus</i> sp.	1,50 x 10 <sup>6</sup>	
		<i>Enterobacter</i> sp.	1,30 x 10 <sup>6</sup>	
		Cocos Gram-negativos	1,24 x 10 <sup>7</sup>	
	Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	6,10 x 10 <sup>6</sup>	
		<i>Enterobacter cloacae</i>	2,40 x 10 <sup>6</sup>	
		Cocos Gram-positivos	1,22 x 10 <sup>7</sup>	
30	Água e esterco bovino	<i>Serratia ureilytica</i>	3,30 x 10 <sup>6</sup>	
		<i>Enterobacter cloacae</i>	2,49 x 10 <sup>7</sup>	
		Bacilo Gram-positivo	2,10 x 10 <sup>7</sup>	
	Efluente de laticínio e esterco bovino	<i>Enterobacter</i> sp.	5,90 x 10 <sup>6</sup>	
		<i>Enterobacter cloacae</i>	2,71 x 10 <sup>7</sup>	
		Bacilo Gram-negativo	7,80 x 10 <sup>6</sup>	
		Bacilo Gram-negativo	1,09 x 10 <sup>7</sup>	

Tabela 16 - Gêneros e espécies de bactérias identificadas ao longo dos 30 dias de incubação da digestão do esterco bovino e das codigestões sem e com adição de hidróxido de sódio, da segunda alimentação. (Conclusão)

Tempo (dias)	Tratamento	Microrganismo	UFC/mL
30	Efluente de laticínio e esterco bovino, com correção de pH (7,0)	<i>Paenibacillus</i> sp.	1,80 x 10 <sup>5</sup>
		<i>Pseudomonas</i> sp.	5,00 x 10 <sup>6</sup>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,30 x 10 <sup>6</sup>
		Cocos Gram-negativos	4,50 x 10 <sup>6</sup>
		Bacilo Gram-negativo	1,09 x 10 <sup>7</sup>
		Cocos Gram-negativos	2,41 x 10 <sup>7</sup>

Fonte: Da autora (2023)

Ao longo dos 30 dias de incubação dos três tratamentos foram identificadas bactérias pertencentes aos filios Proteobacteria e Firmicutes.

Como representantes do filo Proteobacteria foram encontradas as espécies *Ochrobactrum intermedium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia ureilytica* e os gêneros *Enterobacter* e *Pseudomonas*, e como pertencentes ao filo Firmicutes, a espécie *Bacillus cereus*, e os gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*.

Todas as bactérias identificadas são acidogênicas aeróbias ou anaeróbias facultativas. Não foi possível o crescimento de microrganismos anaeróbios estritos, pois a atmosfera utilizada propiciou somente a condição de microaerofilia.

As bactérias acidogênicas pertencem a primeira etapa do processo de degradação da matéria orgânica para a produção de biogás. Os polímeros são hidrolisados em moléculas menores pela ação das exoenzimas das bactérias hidrolíticas e posteriormente, os produtos solúveis, como os açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, são metabolizados no interior das células das acidogênicas, as quais produzem ácidos orgânicos, álcoois, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio (ARCHER; KIRSOP, 1990; ANDERSON et al., 2003; CHERNICHARO, 2019).

*Enterobacter* sp. e *Serratia* sp. são fermentadores de butanediol. Nesta fermentação são produzidos butanediol, etanol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e os ácidos acético, lático e succínico (LIAKOU et al., 2018; PSAKI et al., 2019).

Espécies de *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que clivam polímeros complexos, como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo a

utilização destes produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons (MADIGAN et al. 2016).

A maioria das espécies do gênero *Pseudomonas* pode utilizar uma grande diversidade de compostos orgânicos como fontes de carbono e energia. O catabolismo da glicose e outros monossacarídeos ocorrem pela via de Entner-Doudoroff (MADIGAN et al. 2016).

As espécies do gênero *Ochrobactrum* são organismos não entéricos que estão intimamente relacionados com o gênero *Brucella*. São fastidiosos e reduzem nitratos a nitritos (VELASCO, et al., 2008; RYAN; PEMBROKE, 2020).

Dos microrganismos identificados até o presente momento, os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são relatados por Archer e Kirsop (1990), Anderson et al. (2003) e Chernicharo, (2016), como comumente encontrados na etapa acidogênica de reatores anaeróbios, contendo diversos substratos.

Hagen et al. (2014), destacam a predominância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes no estudo da microbiota da codigestão anaeróbia do permeado de soro de queijo com estrume bovino. A maioria dos microrganismos identificados do filo Bacteroidetes pertence a classe Bacteroidia, e a maioria do filo Firmicutes são da classe Bacilli.

Da contagem dos microrganismos identificados nos três tratamentos e durante os trinta dias de incubação, os gêneros *Enterobacter* e *Bacillus* apresentaram as maiores porcentagens do número total de UFC/mL, correspondendo a 40,16% e 36,9%, respectivamente. Dentro do gênero *Enterobacter* 83,31% são da espécie *Enterobacter cloacae*, e 62,54% do gênero *Bacillus* são *Bacillus cereus*.

## 6 CONCLUSÕES

A mistura do efluente de laticínio e esterco bovino, na proporção de 50%, não apresentou alcalinidade adequada para o desenvolvimento do consórcio metanogênico, porém houve ganho de alcalinidade ao longo do tempo, obtendo-se, ao final dos trinta dias, em todas as alimentações, os valores ideais de alcalinidade total e de pH, para a manutenção da estabilidade do sistema e produção de metano.

Apesar da capacidade inerente do sistema em adquirir alcalinidade, a adição de hidróxido de sódio na codigestão anaeróbia, conferiu maior estabilidade inicial ao processo e maior rendimento de produção de metano.



Os ácidos orgânicos e carboidratos presentes na mistura do efluente de laticínio e esterco bovino foram consumidos pelas bactérias acidogênicas e acetogênicas, ao longo do tempo, porém não houve produção relevante de metano, o que pode ser atribuído a indisponibilidade de acetato, devido a baixa degradação do etanol pelas bactérias acetogênicas. Esta limitação termodinâmica da degradação do etanol, pode ser superada pela interação dos microrganismos acetogênicos com os metanogênicos consumidores de hidrogênio, o que demanda maior tempo de adaptação das arqueias metanogênicas do esterco bovino ao efluente de laticínio para a obtenção de um maior número de células e melhor atividade metanogênica.

O lodo obtido das codigestões anaeróbias, apresentou capacidade de adaptação ao efluente de laticínio, demonstrando seu potencial para uso como inóculo, em partida de reatores, contendo este substrato.

O meio de cultura de soro de queijo, apresentou-se adequado para o crescimento das bactérias acidogênicas, dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Ochrobactrum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia*, podendo ser utilizado em experimentos posteriores, como meio alternativo para o estudo destes microrganismos.

## REFERÊNCIAS

- ADU-GYAMFI, RAVELLA, S. R.; HOBBS, P. J. Optimizing anaerobic digestion by selection of the immobilizing surface for enhanced methane production. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 248-255, 2012.
- AHRING, B. K.; IBRAHIM, A. A.; MLADENOVSKA, Z. Effect of temperature increase from 55 to 65° C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. **Water Research**, v. 35, n. 10, p. 2246- 2452, 2001.
- ANDERSON, K., SALLIS, P., UYANIK, S. Anaerobic treatment processes. In: MARA, D.; HORAN, N. **The handbook of water and wastewater microbiology**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2003. p. 391-396. 832p.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. D. F.; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da atividade Metanogênica específica (ame) em lodos anaeróbios. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.12 – n. 2, p. 192-201, 2007.
- AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p. 152-161, 2005.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Washington: American Public Health Association, 2012.
- ANGELIDAKI, I.; TREU, L.; TSAPEKOS, P.; LUO, G.; CAMPANARO, S.; WENZEL, H.; KOUGIAS, P.G. Biogas up grading and utilization: **Current status and perspectives**. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 452-466, 2018.
- APPELS L., BAEYENS J., DEGREVE J.; DEWIL R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 755-781, 2008.
- ARCHER, D.B.; KIRSOP, B.H. The microbiology and control of anaerobic digestion. 2. ed. In: WHETLEY, A. **Anaerobic digestion: a waste treatment technology**. Londres: Imperial College Press, 1990. p. 43-91. 1395 p.
- BARREIRA, P. **Biodigestores: energia, fertilidade e saneamento para a zona rural**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 2017. 108 p.
- BEIL, M.; BEYRICH, W. Biogas up grading to biomethane. In: WELLINGER, A., MURPHY, J., BAXTER, D. **The biogas handbook: science, production and applications**. Cambridge: Wood head publishing, 2013. p. 342–377.

BERTIN, L.; GRILLI, S.; SPAGANI, A.; FAVA, F. Innovative two-stage anaerobic process for effective codigestion of cheese whey and cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 779–783, 2013.

BUDZIANOWSKI, W. M. Sustainable biogas energy in Poland: Prospect and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 342-349, 2012.

CAETANO, L. **Proposição de um sistema modificado para quantificação de biogás**. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura). Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Botucatu, 1985, 75 p.

CAMPOS, M.P. Produção de biogás por digestão anaeróbia do vinhoto – Parte1. **Brasil Açucareiro**, v. 98, n. 1, p.47-53, 1981.

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.

Charalambous, P.; Shin, J.; Shin, G.S.; Vyrides, I. Digestão anaeróbia de efluentes industriais de laticínios e soro de queijo: desempenho de biorreator de circulação interna e teste de lote de laboratório em pH 5-6. **Renewable Energy**, v. 147, p. 1-10, 2020.

CHARALAMBOUS, P.; VYRIDES, I. In situ biogas upgrading and enhancement of anaerobic digestion of cheese whey by addition of scrap or powder zero-valent iron (ZVI). **Journal of Environmental Management**, v. 280, p. 1-10, 2021.

CIBIOGAS - CENTRO INTERNACIONAL DE ENERGIAS RENOVÁVEIS-BIOGÁS. **Biogas Map**. Foz do Iguaçu, 2021. Disponível em: <<https://mapbiogas.cibiogas.org>> Acesso em: 04 mai. 2023.

COMINO, E.; RIGGIO, V. A.; ROSSO, M. Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 46-53, 2012.

COMINO, E.; ROSSO, M.; RIGGIO, V. Development of a pilot scale anaerobic digester for biogas production from cow manure and whey mix. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5072-5078, 2009.

CHERNICHARO, C. A. L. Reatores Anaeróbios. In: **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2019. 379p.

DENNIS, A.; BURKE, P.E. **Dairy Waste Anaerobic Digestion Handbook**. Olympia: Environmental Energy Company, 2001. 54p.

DEGANUTTI, R.; PALHACI, M. C. J. P.; ROSSI, M.; TAVARES, R. **Biodigestores Rurais: Modelo Indiano, Chinês e Batelada**, 2002. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Biodigestores\\_000g76qdzv02wx5ok0wtedt3spdi71p.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Biodigestores_000g76qdzv02wx5ok0wtedt3spdi71p.pdf)> Acesso em: 25 jan. 2023.

- EBA – EUROPEAN BIOGAS ASSOCIATION. **Statistical report**, 2018. Disponível em:<[https://www.europeanbiogas.eu/wpcontent/uploads/2019/11/EBA\\_report2018\\_abriged\\_A4\\_vers12\\_220519\\_RZweb.pdf](https://www.europeanbiogas.eu/wpcontent/uploads/2019/11/EBA_report2018_abriged_A4_vers12_220519_RZweb.pdf)> Acesso em: 10 fev. 2023.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Embrapa Gado de Leite. **Anuário Leite 2023**, Juiz de Fora, 2023. 120 p.
- ERGÜDER, T., TEZEL, U., GÜVEN, E., DEMIRER, G.N. Anaerobicbiotransformationandmethanegenerationpotentialofcheesewhey in batch and UASB reactors. **Waste Manage**, v.21, p. 643–650, 2001.
- 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.
- FEAM – FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Plano de ação para adequação ambiental das indústrias de recepção e preparação de leite e fabricação de produtos de laticínios no Estado de Minas Gerais**: relatório final - Gerência de Produção Sustentável. Belo Horizonte: FEAM, 2011. 129 p.
- FEAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE; FIEMG - FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS; GIZ - COOPERAÇÃO ALEMÃ PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. **Guia técnico ambiental de biogás na agroindústria**. Belo Horizonte: FEAM, 2015. 160 p.
- FERREIRA; D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FIELD, J. A.; ALVAREZ, R. S.; LETTINGA, G. **Ensayos anaerobios**. In: 4º Seminario de Depuracion Anaerobia de Aguas Residuals. Espanha, Anais. Universidad de Valladolid, p. 52-81, 1988.
- FIEMG - FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Guia Técnico Ambiental da Indústria de Laticínios**. Belo Horizonte: FIEMG, 2014. 70 p.
- FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M. et al. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p.62-69, 2006.
- FORESTI, E. **Fundamentos do processo de digestão anaeróbia**. In: Anais III Taller Y Seminrio Latino Americano: tratamento anaerobio de aguas residuales. Uruguay, p. 97-110, 1994.
- FURTADO, M. A. M.; POMBO, W. Quantificação do soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado através da determinação do número de caseína. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 42, n. 206, p. 3-11, 1988.
- GANTNER, S., ANDERSSON, A.F., ALONSO-SÁEZ, L., BERTILSSON, S. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n.1, p. 12–18, 2011.

GARCIA-ARRIAGA, V.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; AMAYA, M.; SOSA, E. H<sub>2</sub>S and O<sub>2</sub> influence on the corrosion of carbon steel immersed in a solution containing 3M diethanolamine. **Corrosion Science**, v. 52, p. 2268–2279, 2010.

GRIFFIN, M. E.; MCMAHON, K. D.; MACKIE, R. I.; RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during start-up of an anaerobic digester treating municipal solid waste and biosolids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 3, p. 342, 1998.

HAGEN, L. H.; VIVEKANAND, V.; R. LINJORDET, R.; POPE, P. B.; VINCENT G.H. EIJSSINK; HORN, S. J. Microbial community structure and dynamics during co-digestion of whey permeate and cow manure in continuous stirred tank reactor systems. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 350-359, 2014.

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, p. 1-10, 2019.

HAMADY, M., WALKER, J.J., HARRIS, J.K., GOLD, N.J., KNIGHT, R. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. **Nature Methods**, v. 5, n. 3, p. 235–237, 2008.

HANSON G.; MOLIN, N. End product inhibition in methane fermentation: Effects of carbon dioxide and methane on methanogenic bacteria utilizing acetate, **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 13, p. 242–247, 1981.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária**. 2019. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?z=t&o=24&i=P>>. Acesso em: 12 jun. 2023.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3619-3625, 2008.

JETTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. **FEMS Microbiology Reviews**, 88, p. 181-198, 1992.

KARLSSON, T.; KONRAD, O.; LUMI, M.; SCHMEIER, N. P.; MARDER, M.; CASARIL, C. E.; KOCH, F. F.; PEDROSO, A. G.; **Manual Básico de Biogás**. Lajeado: Univates, 2014. 69 p.

KONG, Y.; HE, M.; MCALISTER, T.; SEVIOUR, R.; FORSTER, R. Quantitative fluorescence in situ hybridization of microbial communities in the rumens of Cattle Fed Different Diets. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 20, p. 6933-6938, 2010.

KUNZ, A.; SAQIB, M. Hydrophobic membrane technology for ammonia extraction from wastewaters. **Engenharia Agrícola**, v. 36, p. 377-386, 2016.

KUNZ, A; BASTOS, A. P. A; SCHMIDT, G. S.; LIMA, G. J. M. M.; PEREIRA, M. L. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019. 209 p.

LETTINGA G., HULSHOF POL L. W., ZEEMAN G. **Biological Wastewater Treatment**. Part I: Anaerobic wastewater treatment. Lecture Notes, Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1996.

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

LIN, C.; RASKIN, L.; STAHL, A. A. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted. **Microbiology Ecology**, v. 22, p. 281-294, 1997.

LI, Y.; PARK, S. Y.; ZHU, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p.821-826, 2011.

LIAKOU, V.; PATERAKI, C.; PALAIOGEOURGOU, A. M.; KOPSAHELIS, N.; DE CASTRO, A. M; FREIRE, D. M.G; NYCHAS, G.J.E., PAPANIKOLAOU, S.; KOUTINAS, A. Valorization of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2,3-butanediol. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 27-36, 2018.

MAGANHA, M. F. B. **Guia técnico ambiental de produtos lácteos – Série P + L**. São Paulo: CETESB, 2008. 95 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 960p.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulation of whey-based media for xanthan gum production by *X. Campestris* C7L isolate. **Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001,

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. Boston: McGraw-Hill Education, 2002. 1408 p.

MORAES, E. M.; ADORNI, M. A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. **Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos**. In: Oficina e Seminário Latino – Americano de Digestão Anaeróbia. Recife: editora Universitária – UFPE, 2000. p. 235-238.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 209-232, 1983.

MOTTA, F.S. **Produza Sua Energia - Biodigestores Anaeróbios**. Recife: Recife Gráfica Editora, 1986. 144 p.

NISHIMURA, R. **Análise de balanço energético de sistema de produção de biogás em granja de suínos: implementação de aplicativo computacional.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Campo Grande, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2009. 97p.

NOGUEIRA, L. A. H. **Biodigestão: a Alternativa Energética.** São Paulo: Nobel, 1986. 93 p.  
OLIVEIRA, P. A. V.; Higarashi, M. M. **Geração e utilização de biogás em unidades de produção de suínos.** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006, 42p.

OLIVEIRA, M. M. **Estudo da inclusão de compartimentos em biodigestores modelo canadense.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 118 p.

PATNAIK, R., YOST, R.S., PORTER, G., MASUNAGA, T., ATTANANDANA, T. Improving multi-soil-layer (MSL) system remediation of dairy effluent. **Journal of Ecological Engineering**, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2007.

PSAKI, O.; MAINA, S.; VLYSIDIS, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DE CASTRO, A.M., FREIRE, D.M.G.; DHESKALI, E.; KOOKOS, I.; KOUTINAS, A. Optimization of 2,3-butanediol production by *Enterobacter ludwigii* using sugar cane molasses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 152, p. 1-11, 2019.

QUADROS, D. G.; OLIVER, A. P. M.; REGIS, U.; VALLADARES, R.; SOUZA, P. H. F.; FERREIRA, E. J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos e ovinos em reator contínuo de PVC flexível. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 14, n. 3, p. 326-332, 2010.

RYAN, M.P; PEMBROKE, J. T. The Genus *Ochrobactrum* as Major Opportunistic Pathogens. **Microorganisms**, v.8, n. 11, p. 1-30, 2020.

RAO, P.V.; BARAL, S. S. Attribute based specification, comparison and selection of feedstock for anaerobic digestion using MADM approach. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 2009-2016, 2012.

RAPOSO, F.; DE LA RUBIA, M. A.; FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V.; BORJA, R. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedure. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 861-877, 2012.

RAPOSO, F.; BORJA, R.; MARTÍN, M. A.; MARTÍN, A.; DE LA RUBIA, M. A.; RINCÓN, B. Influence of inoculum–substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: Process stability and kinetic evaluation. **Chemical Engineering Journal**, v. 149, n. 1, p. 70-77, 2009.

REN21 – RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21<sup>ST</sup>CENTURY. **Renewables 2017: global status report.** Paris, 2017. Disponível em: <[http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/06/17-8399\\_GSR\\_2017\\_Full\\_Report\\_0621\\_Opt.pdf](http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/06/17-8399_GSR_2017_Full_Report_0621_Opt.pdf)>. Acesso em: 21 fev. 2022.

RICO, C.; MUÑOZ, N.; RICO, J. L. Anaerobic co-digestion of cheese whey and the screened liquid fraction of dairy manure in a single continuously stirred tank reactor process: Limits in co-substrate ratios and organic loading rate. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 327-333, 2015.

RICO, J. L.; GARCÍA, H.; RICO, C.; TEJERO, I. Characterization of solid and liquid fractions of dairy manure with regard to their component distribution and methane production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 971–979, 2007.

RIVAS, J.; PRAZERES, A.R., CARVALHO, F. Aerobic biodegradation of pre coagulated cheese whey wastewater. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2511-2517, 2011.

SCHIEVANO, A.; D'IMPORZANO, G.; MALAGUTTI, L.; FRAGALI, E.; RUBONI, G.; ADANI, F. Evaluating inhibition conditions in high-solids anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5728-5732, 2010.

SILVA, M. C. P. **Avaliação de lodo anaeróbio e dejetos bovinos como potenciais inóculos para partida de digestores anaeróbios de resíduos alimentares**. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014, 98 p.

SOUZA, J.; RODRIGUES, B. B.; TONDIN, R.; MOTTA, C. A. O.; SCHAEFFERS, L. Usinas para tratamento de RSU: Biodigestão Anaeróbia *versus* Incineração. **Espacios**, v.5, n. 11, p. 2, 2014.

SPERLING, M. V. Princípios Básicos do Tratamento de Esgotos. In: **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2016. 211p.

STEIL, L. et al. Biomass evaluation from anaerobic batch reactors by specific methanogenic activity (SMA) test at different  $S_0/X_0$  ratios. In: **Proceeding 1<sup>st</sup> international meeting on environmental biotechnology and engineering**, México, 2004.

STERN, J. **The future of gas in decarbonizing European energy markets: the need for a new approach**. 2017. Oies Paper: NG 116. Disponível em: <<https://www.oxfordenergy.org/wpcms/wp-content/uploads/2017/01/The-Future-of-Gas-in-Decarbonising-European-Energy-Markets-the-need-for-a-new-approach-NG-116.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

SU, J-J.; HONG, Y-Y. Removal of hydrogen sulfide using a photo catalytic livestock biogas desulfurizer. **Renewable Energy**, v. 149, p. 181-188, 2020.

VELASCO, J.; ROMERO, C.; LÓPEZ-GOÑI, I.; LEIVA, J.; DIAZ, R.; MORIYÓN, I. Evaluation of the lateness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum* anthropic and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 759–768, 1998.



Yan, Z., Song, Z., Li, D., Yuan, Y., Liu, X., Zheng, T. The effects of initial substrate concentration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting rice straw. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 266–273, 2015.

YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. **Water Science and Technology**, v. 52, n.1-2, p. 85-91, 2005.

WARD J., HOBBS J., HOLLIMAN P., JONES D. Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resource: Review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7928–7940, 2008.

WELLINGER, A.; MURPHY, J.; BAXTER, D. **The biogas handbook: science, production and applications**. Cambridge: Wood head publishing, 2013.

ZAHER, U.; D CHEONG, D. Y.; WU, B.; CHEN, S. **Producing Energy and Fertilizer From Organic Municipal Solid Waste. Department of Biological Systems Engineering**. Pullmann: Washington State University, 2007. Disponível em: <<https://fortress.wa.gov/ecy/publications/publications/0707024.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2022.